SIMONE GONÇALVES MORETTO

**Estudo longitudinal da resistência e qualidade de
união de diferentes sistemas adesivos à dentina
irradiada com laser de femtossegundos**

São Paulo

2012

SIMONE GONÇALVES MORETTO

**Estudo longitudinal da resistência e qualidade de
união de diferentes sistemas adesivos à dentina
irradiada com laser de femtossegundos**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Patricia
Moreira de Freitas

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Moretto, Simone Gonçalves.

Estudo longitudinal da resistência e qualidade de união de diferentes sistemas adesivos à dentina irradiada com laser de femtossegundos / Simone Gonçalves Moretto; orientador Patricia Moreira de Freitas. -- São Paulo, 2012.

106 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Dentina. 2. Laser - Odontologia. 3. Adesivos dentinários. 4. Resistência de união. 5. Microscopia eletrônica de Varredura. I. Freitas, Patricia Moreira de. II. Título.

Moretto SG. Estudo longitudinal da resistência e qualidade de união de diferentes sistemas adesivos à dentina irradiada com laser de femtossegundos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Dentística.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A Deus e meu Anjo da guarda, por nunca descuidarem de mim, sempre iluminando meu caminho e providenciando minha defesa na peregrinação deste mundo.

Aos meus queridos pais, Maria Helena e Mauro, pela orientação nos momentos mais decisivos da minha vida, guiando-me para o caminho certo e fazendo-o sempre mais suave. Obrigada pelo apoio, encorajamento e todo o esforço para a educação de seus filhos, que me permitiram hoje chegar até aqui.

Aos meus irmãos Juliana e Eduardo, pelo trabalho em equipe nas nossas intempéries da vida, por viverem junto comigo mais esta empreitada e “segurarem as pontas” quando eu estive ausente. Time de apoio excelente!

Obrigada a todos vocês por entenderem a minha ausência e por me darem todo o suporte para a realização de mais este projeto. Tenho muito orgulho e amo todos vocês!!!

A todos os meus familiares, pela torcida incondicional e vibrações positivas.

Aos meus amigos, aos de perto e aos de longe, por se fazerem sempre presentes em minha vida, transformando-a todos os dias em uma imensa alegria.

A todos aqueles que acreditaram em mim para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora **Profa Dra. Patricia Moreira de Freitas**, exemplo de responsabilidade e competência, por confiar em mim e sempre me apoiar em todos os meus projetos. Meu profundo agradecimento por todas as oportunidades e conhecimentos a mim transmitidos e principalmente, não só por ensinar, mas por me fazer aprender. Foram ótimos anos de convivência, de fundamental importância para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada por estar sempre presente, por todo suporte quando eu estava no exterior, por sua dedicação a este e todos os outros trabalhos que desenvolvemos juntas, pela atenção, paciência e compreensão dos meus momentos difíceis, pela cumplicidade e pela nossa amizade. Tenho muito orgulho de ter sido sua orientada por todos estes anos.

Ao meu orientador no exterior **Prof Dr Bart Van Meerbeek**, por me receber no laboratório BIOMAT da Catholic University of Leuven e por todo apoio e orientação durante minha estada em Leuven. Obrigada por dividir seus conhecimentos, estimulando diariamente minha percepção crítica e por sempre atender prontamente às minhas solicitações, viabilizando a realização dos meus experimentos. Agradeço pelos ótimos momentos, as reuniões, os congressos e os excelentes amigos que tive a oportunidade de conhecer por meio deste estágio.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus queridos **Amigos**, os de longe e os de perto, cada um teve seu papel especial durante todos os anos da realização deste trabalho. Agradeço, por todo interesse, torcida, apoio moral, viagens, conversas, risadas e vibrações positivas que fizeram menos complicados os meus problemas. Considero-me uma pessoa abençoada por ter vocês sempre comigo: **Adri Furlan, Ana Karina & Rui, Angela & Rui, Ayda & Walter, Chrisinha & Marcelo, Cla, Debby Marley, Déia & Renato, Dione, Diego, Eli & André, Kelinha, Laís & Sérgio, Lilian Paráguas, Luáána & Plínio, Lygia & Daniel, Masao & Daniele, Prix, Teka, Vanzinha & Flávio, Vivi Araújo, Vivi Maurman & Rodrigo, aos amigos do RUA** e todos aqueles que mesmo não tão presentes, fazem parte da minha vida.

Ao grande amigo **Marcio Vivan** por me receber tão bem em sua casa e por estar sempre disponível para me ajudar e orientar em todos os departamentos da minha vida: social, sentimental e profissional. Muito obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntos aqui e aí! Foi realmente uma grande prova de amizade me emprestar tantas vezes sua cozinha para meus “experimentos culinários”. Com você aprendi muito sobre a vida, as pessoas e o mundo!

Aos queridos amigos BIOMATERS: **Amol Chaudhari, André Poitevin, Annelies Van Ende, Anne-Katrin Lührs, Athina Mavridou, Jan De Munck, Kirsten Van Landuyt, Kumiko Yoshiraha, Prof Marleen Peumans, Masanao Inokoshi, Ivana Nedeljkovic, Max (Xiaolei Zhang), Nathalie Devolder, Pong Pongprueksa, Shuhei Hélio Fabio, Vesna Miletic e Yuji Ricardinho**. Foi uma honra poder conviver com pesquisadores como vocês e aprender um pouco da cultura de cada um. E também aos amigos que tive o enorme prazer de conhecer em Leuven: **Celi & Carlos, Dirk, Els, Frank, Gabi & Holger, Leonora,**

Marianne & Stijn e Tati. Muito obrigada pelo carinho e amizade, todos vocês fizeram minha estada em Leuven mais do que especial!

Ao **Jimmy Querido**, muitíssimo obrigada por todo amor, carinho e dedicação durante todo este tempo juntos. Obrigada pela compreensão de todos os meus momentos difíceis, sempre me dando suporte e enviando suas energias, de fundamental importância para a conclusão deste projeto. Obrigada por estar sempre presente, fazendo meus dias mais leves e alegres, dividindo comigo as dificuldades e alegrias desta empreitada e principalmente por cuidar tão bem de mim. Juntos nós somos muito melhores! Agradeço também a seus pais e familiares que sempre me receberam muito bem, fazendo com que eu me sentisse em casa.

Aos meus colegas de turma e aos demais colegas de Pós-graduação que conheci durante todos esses anos de FOUSP. Foi um prazer enorme dividir e aprender com vocês durante os créditos, trabalhos de laboratório e estágios. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

À amiga e ex-colega de Pós-Graduação **Profa. Dra. Marina Stella Bello Silva**, por fornecer os contatos com a equipe do ILT e pela ajuda com as minhas dúvidas durante a realização deste projeto. Foi um grande prazer poder seguir a linha de pesquisa iniciada em seu doutorado na Alemanha! Tenho muita admiração por você e sua dedicação ao trabalho e à pesquisa. Muito obrigada pelas nossas aventuras inenarráveis de viagens, pelas risadas, pelas parcerias e pela nossa amizade!

Ao **Dr. Martin Wehner** por me receber no Instituto Fraunhofer de Laser (ILT) em Aachen e sua dedicação juntamente com o **Martin Hermans** para possibilitar a irradiação de todas as amostras com o laser de femtossegundos em tempo hábil para a realização de todos os experimentos programados.

À querida **Nathalie Devolder** pela ajuda na obtenção das micrografias em MEV.

Ao colega **Jan De Munck** pela análise estatística dos resultados.

A toda a equipe e amigos do LELO: **Lili, Gê, Elaine, Ly Simões, Karen Muller, Leila, Ju Marotti, Lu Azevedo, Patty, Ciça e Prof. Carlos** que sempre me ajudaram prontamente em todas as minhas dúvidas, e necessidades.

Obrigada ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez** e ao **Niltinho**, por toda paciência e orientação com o MEV.

À **Profa. Dra. Ana Cecília Corrêa Aranha**, por todo carinho, amizade e atenção durante todos estes anos.

Ao **Prof. Carlos de Paula Eduardo**, por todas as oportunidades e motivação para o desenvolvimento da pesquisa científica.

À amiga, **Profa. Dra. Eliza Maria Agueda Russo** que incentivou e confiou em mim para o ingresso na Pós-Graduação. Agradeço pela grata amizade durante todos estes anos.

À **Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino**, ex-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística, pelo trabalho desenvolvido com a Pós-Graduação e por toda dedicação às necessidades dos alunos.

À **Profa. Dra. Margareth Oda**, pelas ótimas conversas e ensinamentos durante as aulas de Escultura, não somente referentes ao aprendizado da Odontologia, mas também da vida e suas particularidades.

À **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística, pela dedicação para a manutenção da qualidade do curso, atenção com os alunos, pelas viagens e pelas ótimas experiências que trocamos e vivemos juntas.

A todos os Professores do Departamento de Dentística da FOU SP, pela competência, dedicação e pelos valiosos ensinamentos a mim transmitidos.

Ao amigo **Prof Dr. Paulo Francisco César (PC)**, pelo suporte durante a realização dos trabalhos realizados em conjunto com o

Departamento de Biomateriais e Biologia Oral. Muito obrigada pelas longas e agradáveis conversas em sua sala, por todos os conselhos e principalmente pela amizade!

A todos os funcionários do Departamento de Dentística, **Soninha, David, Selma, Aldo, Ana e Leandro** pela dedicação ao Departamento, além da sempre disposta ajuda nas questões diárias da Pós-Graduação.

À **Profa Dra. Marina Helena C. Gallotini**, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FOUSP e às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação **Alessandra, Kátia e Veridiana** por toda atenção, ajuda, orientação e suporte com as questões burocráticas da Pós-Graduação desde o início do curso.

Aos professores e funcionários do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP **Profa Dra. Márcia T. Wanderley**, à **Profa. Dra. Maria Gabriela Biazevic** e à **Mirtes R. Staduto**, pela orientação e dedicação para aprovação deste projeto no CEP e CONEP.

À **Glauci** pela revisão da formatação deste documento.

À Universidade de São Paulo, representada pelo Magnífico Reitor **Prof. Dr. João Grandino Rodas**. E à Faculdade de Odontologia de São Paulo – FOUSP, representada por seu Diretor, **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de doutorado, além da bolsa de doutorado sanduíche **BEX- 6814/10-07** me dando a grande oportunidade de enriquecer meu conhecimento através da pesquisa científica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*"E assim, depois de muito esperar,
num dia como outro qualquer, decidi triunfar...
Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las."*

Walt Disney

*"O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos."*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Moretto SG. Estudo longitudinal da resistência e qualidade de união de diferentes sistemas adesivos à dentina irradiada com laser de femtossegundos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Recentemente, os lasers de pulsos ultracurtos têm sido avaliados para o preparo dos tecidos duros dentais devido à sua habilidade de reduzir os efeitos térmicos resultantes da irradiação. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de união de 3 sistemas adesivos à dentina preparada com o laser de femtossegundos (10^{-15} s). Para isso, 60 terceiros molares foram preparados com o laser de femtossegundos (1.450 nm; 0,3W; 100.000Hz) ou ponta diamantada, divididos em 3 subgrupos (n=10) restaurados utilizando o adesivo condicione e lave de 3 passos Optibond FL (OFL; Kerr), o autocondicionante de 2 passos Clearfil SE (CSE; Kuraray) ou o autocondicionante de 1 passo G-aenial Bond (GAB; GC). Após 1 semana de armazenamento em água, os dentes foram seccionados (1,0x1,0 mm) e testados imediatamente e após 6 meses de armazenamento. Vinte e quatro amostras adicionais foram preparadas com o laser ou ponta diamantada conforme descrito acima. Seis amostras foram seccionadas em espécimes menores e aleatoriamente preparados para observação das características morfológicas da superfície (n=3) e subsuperfície (n=3) em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (n=3) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (n=3). As outras 18 amostras foram restauradas com os sistemas adesivos supramencionados, seccionados em espécimes menores e distribuídos para avaliação da interface adesiva em MEV (n=3) e padrão de nanoinfiltração após 1 semana (n=2) e 6 meses (n=2) em MET. O modelo linear de efeitos mistos ($\alpha=0,05$) revelou um efeito significativo dos fatores "adesivo", "armazenagem" e a interação "preparo x armazenagem" na resistência de união. Todos os adesivos apresentaram

uma redução significativa da resistência de união após 6 meses de armazenamento ($p < 0,0001$) para ambos os tipos de preparo. Com relação ao sistema adesivo, a única diferença verificada foi o maior valor de resistência de união do GAB quando aplicado sobre as superfícies irradiadas ($56,71 \pm 10,72$ MPa) quando comparadas com as preparadas com ponta diamantada ($43,14 \pm 14,93$ MPa) após 1 semana de armazenamento. A análise de fratura revelou fraturas mistas, adesivas e coesivas em dentina para ambos os métodos de preparo com um discreto aumento do número de fraturas mistas após 6 meses de armazenamento exceto para o GAB, que apresentou principalmente fraturas adesivas e mistas. A análise em MEV revelou uma fina camada de debris sobre a superfície da dentina irradiada e a hibridização com todos os sistemas adesivos resultou num íntimo contato da interface adesiva com o substrato. A análise em MET da subsuperfície irradiada revelou fibrilas colágenas preservadas. A análise da interface adesiva revelou um aumento dos depósitos de prata na camada híbrida para todos os adesivos, após 6 meses de armazenamento, independentemente do tipo de preparo. Apenas o GAB apresentou maiores depósitos de prata após 1 semana de armazenamento para as superfícies preparadas com ponta diamantada. A irradiação com o laser de femtossegundos não reduziu a receptividade da dentina aos sistemas adesivos, resultando em valores de resistência de união similares aos obtidos com a ponta diamantada; além de uma ótima interação do substrato com os sistemas adesivos e deposições de prata similares às aquelas obtidas com a ponta diamantada.

Palavras chave: Dentina. Laser de Femtossegundos. Sistemas adesivos. Resistência de união. Microscopia Eletrônica de Varredura. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Nanoinfiltração.

ABSTRACT

Moretto SG. Long term evaluation of bond strength and quality of the interface of different adhesive systems to femtosecond laser irradiated dentin [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Recently, the applicability of ultrashort pulsed lasers has been studied for dental hard-tissue irradiation because of its reduced residual thermal damage. The aim of this study was to determine the bonding effectiveness of 3 contemporary adhesive systems to dentin prepared by femtosecond (10^{-15} sec) laser-irradiation. For this, 60 third molars were prepared either by the femtosecond laser (1450 nm; 0.3W; 100,000Hz) or by bur, randomly divided into 3 subgroups (n=10) and restored with a composite using either the 3-step etch-and-rinse adhesive Optibond FL (OFL; Kerr), the 2-step self-etch adhesive Clearfil SE (CSE; Kuraray) or the 1-step self-etch adhesive G-aenial Bond (GAB; GC). After 1-week water storage, the teeth were sectioned (1.0x1.0 mm) and half of the specimens were tested until failure using a micro-tensile bond-strength (μ TBS) approach. The other half was stored in water and tested after 6 months. Twenty-four additional dentin samples were exposed to the diamond bur and the laser, following the same abovementioned parameters. Three samples of each treatment were sectioned in smaller specimens in order to be characterized for surface (n=3) and cross-sectional morphological analysis using Scanning Electron Microscopy (SEM) (n=3) and Transmission Electron Microscopy (TEM) (n=3). The other eighteen samples were hybridized with the abovementioned adhesive systems, sectioned in smaller samples and distributed for evaluation of the interface under SEM (n=3) and nanoleakage distribution for 1 week (n=2) and 6 months (n=2) under TEM. Linear mixed effect model ($\alpha=0.05$) revealed a significant effect of the factors "adhesive", "storage" and the interaction of

“preparation x storage” on the μ TBS. All adhesives presented a significant reduction of the bond strength after 6-month storage ($p < 0.0001$) for both preparation methods. Regarding the adhesive system, the only difference found was a significantly higher μ TBS of GAB to laser-irradiated (56.71 ± 10.72 MPa) than to bur-cut dentin (43.14 ± 14.93 MPa) after 1-week water storage. Fracture analysis showed mixed, adhesive and cohesive failures in dentin similarly for both preparation methods with a slightly increase of the mixed failures after 6-months water storage for OFL and CSE, but not for GAB that presented mainly adhesive and mixed failures. SEM disclosed a thin layer of debris on the laser-irradiated dentin surface and the hybridization with all adhesive systems resulted in a very tight interface. TEM analysis of the irradiated subsurface revealed collagen fibrils preserved and for the nanoleakage evaluation an increase of silver deposits at hybrid layer for all adhesives testes after 6-months water storage, irrespective of the preparation methods. Only the GAB presented great silver deposits even after 1-week water storage for the bur-cut preparation method. Femtosecond laser irradiation did not reduce the bonding receptiveness of dentin resulting in similar values obtained with the preparation by bur. Additionally it led to a great interaction with different adhesive systems and silver deposits comparable to those obtained with the bur-cut preparation method.

Keywords: Dentin. Femtosecond laser. Adhesive systems. Bond strength. Scanning Electron Microscopy. Transmission Electron Microscopy. Nanoleakage.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CSE	Clearfil SE
DP	Desvio Padrão
Er:YAG	érbio:ítrio-alumínio-granada
Er,Cr:YSGG	érbio-cromo:ítrio-escândio-gálio-granada
fs	femtosegundo(s)
GAB	G-aenial Bond
HEMA	Hidroxietil Metacrilato
HMDS	Hexadimetilsilazane
Hz	Hertz
J/cm ²	joule(s) por centímetro quadrado
LPUC	Laser de pulsos ultracurtos
µm	micrômetro(s)
µs	microsegundo(s)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
min	minuto(s)
mm	milímetro(s)
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
mm/s	milímetro(s) por segundo

mm/min	milímetro(s) por minuto
mW/cm ²	miliwatt(s) por centímetro quadrado
nm	nanômetro(s)
ns	nanossegundo(s)
OFL	Optibond FL
ps	picossegundo(s)
SiC	Carbeto de silício
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

W	watt(s)
n	Número de espécimes
°C	grau(s) celsius
h	hora(s)
M	Molar
N	Newton
MPa	Mega Pascal
s	segundo(s)
kV	kilovolt
°	grau(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 LASER DE ALTA POTÊNCIA PARA REMOÇÃO DE TECIDO DURO DENTAL	22
2.2 ADESÃO: SISTEMAS E TÉCNICAS ADESIVAS	28
2.2.1 Técnica condicione e lave	29
2.2.2 Técnica autocondicionante	31
2.3 ADESÃO AOS TECIDOS DUROS DENTAIS	33
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 TESTE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO: MICROTRAÇÃO	38
4.1.1 Preparo com Ponta diamantada	39
4.1.2 Preparo com Laser de Femtossegundos (fs)	40
4.1.3 Restauração das amostras	41
4.1.4 Teste de resistência adesiva	43
4.1.5 Análise do padrão de fratura em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE	47
4.2.1 MEV	47
4.2.2 MET	48
4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA INTERFACE DE UNIÃO	50
4.3.1 MEV	51
4.3.2 MET - Nanoinfiltração	52
5 RESULTADOS	54
5.1 TESTE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO: MICROTRAÇÃO	54
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE	62
5.2.1 MEV	62
5.2.2 MET	67
5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA INTERFACE DE UNIÃO	70

5.3.1 MEV	70
5.3.2 MET	72
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICES	104
ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

A evolução dos sistemas restauradores adesivos e um maior entendimento sobre o processo de desenvolvimento da cárie primária e recorrente levou ao surgimento de um novo conceito praticado hoje na Odontologia, que visa a máxima preservação dos tecidos dentais, denominado Mínima Intervenção (Tyas et al., 2000; Peters; McLean, 2001).

A utilização do laser na Odontologia veio contribuir com este conceito, por ser um grande aliado na remoção seletiva do tecido cariado e realização de preparos minimamente invasivos. Os lasers de Er:YAG (2,94 μm) e Er,Cr:YSGG (2,78 μm) são os lasers utilizados atualmente para a realização de preparos cavitários, pois seus comprimentos de onda possuem grande afinidade pela água e hidroxiapatita presentes nos tecidos duros dentais (Li et al., 1992).

Os lasers de érbio possuem uma largura (duração) de pulso de aproximadamente 200 a 250 μs . Estudos demonstram que quanto maior a largura de pulso, maior o calor residual durante a irradiação (Fried et al., 2001). O calor residual pode levar a danos na subsuperfície irradiada denaturando as fibrilas colágenas (Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011) e gerando microtrincas na dentina peritubular (Cardoso et al., 2008a; Moretto et al., 2011). Estes efeitos podem prejudicar a retenção micromecânica promovida pela infiltração do sistema adesivo nessa rede de fibrilas, comprometendo a integridade da interface adesiva (Ceballos et al., 2002; Cardoso et al., 2008a; Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011) e, conseqüentemente, a longevidade da restauração (do Amaral et al., 2008).

Na década de 90 surgiram os lasers com largura de pulso ultracurta: picosegundos (ps) (10^{-12} segundos) e femtossegundos (fs) (10^{-15} segundos). Estudos com estes lasers têm sido realizados com o objetivo

de minimizar os efeitos termomecânicos comumente observados nos tecidos irradiados com os lasers de pulsos curtos ou longos (nano ou microssegundos).

O preparo cavitário com os lasers de érbio acontece através do processo de ablação termomecânica, que consiste no aumento na temperatura na superfície do tecido, levando a micro explosões na estrutura irradiada que removem o tecido desejado (Rizoiu et al., 1998). Já a ablação observada com os lasers de pulso ultracurtos não está relacionada com o aumento de temperatura, mas com uma alteração eletrostática que ocorre na superfície do tecido irradiado (Kim et al., 2001). Essa diferença no mecanismo de ablação leva a modificações na morfologia do tecido irradiado diferentes daquelas comumente descritas na literatura causadas para os lasers de pulsos longos, e sem danos à estrutura dental irradiada ou adjacente (Rode et al., 2003; Bello-Silva Marina Stella, 2010; Ji et al., 2012).

Diferentemente do que tem sido descrito na literatura para os lasers de pulsos longos (microssegundos), estudos preliminares demonstraram resultados favoráveis à união dos sistemas adesivos dentinários disponíveis atualmente no mercado aos tecidos irradiados com lasers de pulsos ultracurtos, quando comparados às técnicas convencionais de preparo cavitário (Bello-Silva Marina Stella, 2010).

Os sistemas adesivos comercializados atualmente possuem composições e técnicas de aplicação bastante variadas (Van Meerbeek et al., 2003; Perdigao, 2010b; Cardoso et al., 2011) e sua interação com o tecido dental pode variar de acordo com o tipo de preparo realizado e a qualidade do substrato (Kenshima et al., 2006; Cardoso et al., 2008b; Ermis et al., 2008; Perdigao, 2010b).

A qualidade da união entre os sistemas adesivos e o substrato dental está diretamente relacionada à eficiência de penetração dos monômeros resinosos nos espaços interfibrilares e o grau de conversão destes monômeros (Navarra et al., 2009; Hass et al., 2012).

Apesar dos estudos indicarem bons resultados nos testes realizados nas estruturas dentais imediatamente após o procedimento adesivo, diversos estudos na literatura tem reportado uma degradação da união entre o substrato dental e o sistema adesivo ao longo do tempo (Okuda et al., 2002; Reis AF et al., 2004; De Munck et al., 2011; Hass et al., 2012; Mobarak; Daifalla, 2012).

A degradação em longo prazo dos adesivos dentinários atuais aplicados sobre superfícies preparadas convencionalmente com ponta diamantada ou lixas de SiC, está bem relatada na literatura; entretanto, o efeito dos lasers de pulsos ultracurtos na ultraestrutura dentinária e na qualidade de união imediata e em longo prazo a este substrato, ainda não foram completamente descritos na literatura.

Assim, torna-se importante verificar a estabilidade em longo prazo de diferentes sistemas adesivos aplicados sobre as superfícies irradiadas com os lasers de pulsos ultracurtos tanto para a qualidade da resistência de união quanto para a degradação hidrolítica da camada híbrida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LASER DE ALTA POTÊNCIA PARA REMOÇÃO DE TECIDO DURO DENTAL

Estudos sobre o uso do laser em Odontologia têm sido realizados por mais de 50 anos. Os primeiros resultados da utilização *in vitro* do laser na Odontologia foram descritos por (Goldman et al., 1964; Stern; Sognnaes, 1964) que irradiaram o esmalte dental e observaram sua vaporização pelo laser, bem como a maior afinidade do laser pelo tecido cariado, demonstrando a importância da seleção corretas dos parâmetros de irradiação. No mesmo período (Zach; Cohen, 1965), através de um estudo em dentes de macacos *Rhesus*, determinaram que elevações da temperatura pulpar superiores a 5,5°C deveriam ser evitadas sob o risco de danos irreversíveis à vitalidade do tecido pulpar.

Estudos com o objetivo de encontrar um comprimento de onda seguro e passível de utilização clínica em Odontologia seguiram até o surgimento dos lasers de érbio em 1989, quando (Hibst; Keller, 1989) demonstraram a utilização do laser de Er:YAG (érbio: ítrio, alumínio, granada) em tecidos duros com resultados promissores. Desde então, avanços nessa tecnologia têm introduzido novos equipamentos, com diferentes comprimentos de onda, possibilitado seu uso em diversas especialidades.

Logo após o surgimento do laser de Er:YAG (2,94 μm) foi introduzido no mercado os lasers de Er:YSGG e Er,Cr:YSGG (2,78 μm) com um comprimento de onda similar ao laser de Er:YAG. Ambos têm sido bastante estudados, pois seus comprimentos de onda possuem grande afinidade pela água e hidroxiapatita presentes nos tecidos duros dentais (Li et al., 1992). Com parâmetros utilizados para a realização de preparos cavitários, os lasers de érbios provocam micro explosões na estrutura

dental irradiada, removendo o tecido desejado através do processo de ablação termomecânica (Hibst; Keller, 1989; RizoIU et al., 1998).

Em geral, as superfícies dentinárias irradiadas com os lasers de érbio apresentam a superfície irregular, livre da camada de esfregaço, com os túbulos dentinários abertos e a dentina peritubular levemente protruída (Freitas PM et al., 2007; Moretto et al., 2010). Entretanto, avaliações morfológicas das superfícies irradiadas têm demonstrado que o processo de ablação com os lasers de érbio pode resultar em efeitos termomecânicos nos tecidos, como a formação de trincas na subsuperfície (Cardoso et al., 2008a; Moretto et al., 2011) e denaturação das fibrilas colágenas (Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011). Estes efeitos podem prejudicar a retenção micromecânica promovida pela infiltração do sistema adesivo na rede de fibrilas, comprometendo a integridade da interface adesiva (Ceballos et al., 2002; Cardoso et al., 2008a; Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011) e, conseqüentemente, a longevidade da restauração (do Amaral et al., 2008).

Estudos têm relacionado estes efeitos termomecânicos com a duração (largura) de pulso destes lasers, que pode variar de 200 a 250 microssegundos (μs) (10^{-6} segundos), também denominados como pulsos longos. Quanto maior a largura de pulso, maior o calor residual resultante da irradiação que se difunde através do tecido irradiado (Niemz, 1995; Stuart et al., 1996; Fried et al., 2001; Jiao; Guo, 2012). Desta maneira, estudos com lasers com uma menor largura de pulso têm sido realizados com o objetivo de minimizar ou superar estes efeitos deletérios causados pela irradiação com os lasers de pulsos longos. O laser de Excimer KrF possui uma duração de pulso curta de aproximadamente 30 nanossegundos (ns) (10^{-9} segundos) e, diferentemente do tipo de ablação resultante da irradiação com os lasers de érbio, a ablação verificada para este laser ultravioleta (248 nm) é a fotoquímica. Esta diferença no tipo de ablação levou a resultados bastante positivos com a formação de cavidades precisas sem danos à estrutura dental adjacente (Eugenio et

al., 2005). Entretanto, devido à baixa taxa de ablação e aos riscos da radiação UV, estudos adicionais para o uso deste laser na Odontologia não foram estimulados (Franjic et al., 2009).

Na década de 90 surgiram os lasers com largura de pulso ultracurta: picossegundos (ps) (10^{-12} segundos) e femtossegundos (fs) (10^{-15} segundos). Diferentemente dos tipos de ablação observados com os lasers de pulso curtos (ns) e longos (μ s) e que removem o tecido através da ablação termomecânica, a ablação observada com os lasers de pulso ultracurtos (LPUC) não está relacionada com o aumento de temperatura, mas com uma alteração eletrostática que ocorre na superfície do tecido irradiado também conhecida por ablação mediada por plasma (Oraevsky et al., 1996; Kim et al., 2001).

A ablação mediada por plasma pode ser dividida em 2 fases distintas: a ionização multifotônica, seguida pela avalanche de elétrons com a formação do plasma (Stuart et al., 1996; Jiao; Guo, 2012).

A primeira etapa do processo é desencadeada pela alta energia do pulso do laser que promove uma ionização das moléculas da superfície levando a geração de elétrons livres (ionização multifotônica) (Oraevsky et al., 1996; Kim et al., 2001; Jiao; Guo, 2012). Esta ionização leva a uma excitação dos elétrons na superfície que vão se chocando e adquirindo uma crescente energia cinética até atingirem a densidade de elétrons crítica para a formação do plasma (Oraevsky et al., 1996). Como a fotoionização é extremamente dependente da intensidade, a produção de elétrons acontece principalmente no pico do pulso do laser de perfil Gaussiano (Stuart et al., 1996).

Na segunda etapa, uma avalanche de elétrons acontece na superfície e a energia absorvida é transferida dos elétrons ao tecido, em uma escala de décimos de ps (Oraevsky et al., 1996), resultando na formação de uma nuvem submicrométrica de plasma (Stuart et al., 1996). Isso ocorre em uma fração de segundos tão pequena, que o material ejetado rapidamente durante a irradiação absorve grande parte da

energia que se dissipa antes mesmo que o calor possa se difundir nos tecidos. Como resultado, tem-se um corte preciso, sem transferência de calor ou prejuízo para as estruturas adjacentes (Kim et al., 2000; Kim et al., 2001). Isso ocorre porque durante a irradiação com os lasers de pulsos ultracurtos a energia é absorvida mais rapidamente pelos elétrons do que pelas moléculas do tecido (Oraevsky et al., 1996). Assim, a penetração da luz no tecido acontece em uma camada extremamente superficial de aproximadamente 0,1 a 0,2 μm . Como uma quantidade muito pequena de material (da ordem de picogramas) é removida por pulso, é necessária uma alta taxa de repetição para alcançar uma taxa razoável de remoção de material (Feit et al., 1998).

Quando todos os elétrons da superfície estão ionizados, a energia adicional absorvida pelos elétrons se transforma rapidamente em calor, resultando em uma rápida diminuição da absorção de luz pelos elétrons com simultâneo aumento da reflexão da luz. Isso porque acima do limiar de ablação a densidade de elétrons na superfície vai aumentando, até que não consegue mais se propagar no tecido devido à reflectibilidade do plasma (Oraevsky et al., 1996). Assim, um aumento na densidade de energia muito acima do limiar de ablação do tecido, pode levar a uma diminuição da ablação devido à reflexão da luz pelo plasma formado na superfície (Oraevsky et al., 1996; Murray; Dickinson, 2004). Logo, a densidade de energia deve ser mantida em um nível ótimo e a taxa de repetição pode ser aumentada para se obter um aumento da velocidade de ablação.

Existe um limiar que determina a ablação mediada por plasma. A densidade de elétrons livres deve ser superior a este valor para ser capaz de desencadear a avalanche de elétrons; ou seja, a excitação de apenas 1 elétron não é capaz de desencadear a avalanche de elétrons responsável pela formação do plasma (Jiao; Guo, 2012).

O limiar de ablação é denominado como a menor densidade de energia (fluência) necessária para promover alterações morfológicas nos

tecidos irradiados e aumenta na proporção da raiz quadrada da duração do pulso dos LPUC (Oraevsky et al., 1996; Stuart et al., 1996), ou seja, quanto menor a duração do pulso, menor a densidade de energia necessária para iniciar a ablação dos tecidos (Niemz, 1995; Oraevsky et al., 1996; Kim et al., 2001).

A precisão de corte que pode ser alcançada com os LPUC torna sua utilização bastante atrativa para ablação dos tecidos duros dentais. Os primeiros resultados a irradiação com o LPUC na estrutura dental foram reportados por Niemz em 1994 (Niemz, 1994) demonstrando a efetividade do laser com duração de pulso na ordem de ps na confecção de preparos cavitários em esmalte e dentina, além de sua habilidade em remover seletivamente o tecido cariado. Desde então, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a qualidade de interação dos LPUC com o tecido duro dental.

Assim como observado com os lasers de pulsos longos, os diferentes tecidos dentais apresentam comportamentos diferentes frente à irradiação com LPUC. Devido à diferença na composição dos tecidos mineralizados dentais, o limiar de ablação para a dentina é menor do que para o esmalte (Niemz, 1995; Kruger et al., 1999; Dutra-Correa et al., 2011; Bello-Silva M. S. et al., 2012; Ji et al., 2012).

Diferentemente dos lasers de pulsos longo, no qual o comprimento de onda do laser desempenha um papel fundamental na ablação do tecido, para os LPUC este processo acontece independentemente da estrutura mecânica e composição molecular do tecido (Oraevsky et al., 1996). Assim, os LPUC são capazes de ablacionar seletivamente os materiais restauradores dentais como cimento de fosfato de zinco, cerâmica, resina composta (Braun et al., 2012) e até amálgama (Freitas AZ et al., 2010). Como o limiar de ablação para estes materiais é inferior ao observado para o esmalte dental (Freitas AZ et al., 2010), a ablação seletiva das resinas compostas é de grande valia na clínica diária, pois durante a remoção de uma restauração deficiente, pode haver a remoção

desnecessária de tecido sadio devida à grande semelhança do material com o substrato dental (Freitas AZ et al., 2010). Entretanto, atenção deve ser tomada com relação ao aumento de temperatura durante a remoção destes materiais (Braun et al., 2012).

Embora, durante o processo de ablação mediado por plasma, a maior parte da energia seja consumida pelo processo de ablação, diferenças significativas no aumento de temperatura do tecido irradiado, podem ser observadas dependendo da duração do pulso (ps ou fs) (Bello-Silva M. S. et al., 2012). Entretanto, os poucos resultados disponíveis na literatura (Kim et al., 2000; Rode et al., 2003; Fahey et al., 2008; Bello-Silva M. S. et al., 2012; Braun et al., 2012), associados às diferenças de metodologias, ainda não permitem uma afirmação precisa sobre o aumento de temperatura resultante da irradiação com os LPUC e mais estudos se fazem necessários.

Análises morfológicas das estruturas dentais (esmalte e dentina), em geral, apresentaram excelentes resultados com a obtenção de cavidades bem delimitadas, sem a presença de trincas ou danos térmicos à superfície irradiada ou às estruturas adjacentes (Niemz, 1995; Rode et al., 2003; Fahey et al., 2008; Bello-Silva M. S. et al., 2012; Ji et al., 2012).

Considerando os princípios da Odontologia Minimamente Invasiva, que se baseia na máxima preservação das estruturas dentais sadias (Tyas et al., 2000), os preparos cavitários conservadores devem preparar adequadamente as paredes da cavidade para aplicação do sistema adesivo e subsequente restauração adesiva já que tais preparos não conta com a remoção de estrutura dental sadia para a obtenção de retenção adicional.

Estudos preliminares demonstraram resultados favoráveis à resistência de união imediata dos adesivos dentinários a estes tecidos irradiados, com valores de resistência de união semelhantes àqueles obtidos com as técnicas convencionais de preparo cavitário (Bello-Silva

Marina Stella, 2010), superando um dos problemas verificados com o preparo dos tecidos duros dentais com os lasers de pulsos longos (Moretto et al., 2011).

A união efetiva aos substratos dentais tem sido um dos tópicos de maior estudo na área da odontologia restauradora. Diversos estudos estão disponíveis na literatura avaliando a união dos sistemas adesivos aos substratos dentais preparados com as diversas técnicas de preparo cavitário. Entretanto, devido à grande diversidade dos resultados, a busca pela técnica e material ideal para restauração ainda continuam.

2.2 ADESÃO: SISTEMAS E TÉCNICAS ADESIVAS

Desde a introdução do condicionamento ácido em 1955 por Buonocure constantes mudanças na composição química dos materiais restauradores adesivos têm influenciado significativamente na sua evolução, resultando na extensa variedade de sistemas adesivos disponíveis comercialmente no mercado. Um entendimento das suas características e técnicas de aplicação é de fundamental importância para a escolha do material mais adequado para cada situação clínica e para o melhor desempenho do material imediato e em longo prazo.

Para isso, é importante entender como os sistemas adesivos interagem com o substrato dental. Basicamente, a união dos sistemas adesivos ao esmalte e dentina está relacionada com a remoção de minerais dos tecidos duros dentais e com a penetração de monômeros resinosos nestas microporosidades, resultando na retenção micromecânica do adesivo (Nakabayashi et al., 1982; Pashley; Carvalho, 1997)

A resultante deste processo é a formação de uma camada intermediária entre o substrato dental e o material restaurador adesivo, conhecida como camada híbrida (Nakabayashi et al., 1982).

Nakabayashi et al. (1982) foram os primeiros a descreverem a formação da camada híbrida na dentina após o condicionamento, comprovando que os monômeros resinosos eram capazes de penetrar nas microporosidades promovidas pelo ácido resultando em uma estrutura composta por uma matriz resinosa, reforçada por fibrilas de colágeno.

Esta técnica de hibridização dos tecidos dentais utilizando-se um ácido para a posterior infiltração do adesivo ficou conhecida como “condicionamento total” (Fusayama et al., 1979). Entretanto, como após a aplicação do ácido é realizada a lavagem com água, atualmente o termo mais aceito é “condicione e lave”. Tal nomenclatura foi proposta por Van Meerbeek et al em 2003 (Van Meerbeek et al., 2003) com o objetivo de simplificar as nomenclaturas de acordo com a técnica de aplicação dos adesivos, diferentemente de como era anteriormente, quando a classificação era determinada pela cronologia de lançamento, também conhecida como “geração” (1ª a 7ª) do adesivo (Perdigao, 2010a).

Assim, os sistemas adesivos podem ser divididos em 2 grandes grupos: os sistemas “condicione e lave” e os “autocondicionantes” (Van Meerbeek et al., 2003; Perdigao, 2010b):

2.2.1 Técnica condicione e lave

Foi a primeira técnica utilizada clinicamente.

O primeiro passo de aplicação consiste na aplicação de um ácido com o objetivo de remover a camada de esfregaço que se forma na superfície da dentina após o preparo cavitário, abrindo a entrada dos

túbulos dentinários e promovendo uma desmineralização da camada superior da dentina com exposição das fibrilas colágenas (Pashley et al., 2011). É importante que o ácido seja lavado vigorosamente para remoção completa dos produtos resultantes da desmineralização e para a manutenção da matriz dentinária desmineralizada expandida.

Na etapa subsequente, a aplicação de um primer contendo monômeros hidrofílicos, diluídos em solução de solventes orgânicos, é realizada com o objetivo de penetrar na rede de fibrilas exposta pelo condicionamento ácido e aumentar a energia de superfície, facilitando a posterior infiltração do adesivo. Esta é uma etapa crítica desta técnica, pois caso o excesso de água não seja removido adequadamente, a água pode levar a uma alteração de fase dos adesivos (Ye et al., 2009); no caso de secagem excessiva do substrato, pode levar ao colapso das fibrilas colágenas impedindo uma adequada difusão dos monômeros resinosos do adesivo (Tay et al., 1996).

O adesivo consiste de uma solução de monômeros hidrofóbicos que tem como objetivo permear a rede de fibrilas colágenas e a entrada dos túbulos dentinários, resultando, após sua polimerização, na formação da camada híbrida (Pashley et al., 2011).

Com o objetivo de simplificar a técnica tradicional de 3 passos, os fabricantes agruparam o primer e o adesivo em um único frasco, resultando no surgimento dos adesivos “condicione e lave de 2 passos”. Apesar de apresentarem uma técnica de aplicação mais fácil, estes adesivos tendem a se comportar de uma maneira inferior quando comparados com os adesivos “condicione e lave de 3 passos” (Peumans et al., 2005; De Munck et al., 2006; Sarr et al., 2010; Pashley et al., 2011). A hidrofiliabilidade destas soluções as torna mais susceptíveis à sorção de água e, conseqüentemente, à degradação hidrolítica (Yiu et al., 2004).

Inúmeros adesivos, com diferentes monômeros resinosos e tipos de solventes estão disponíveis atualmente. Independentemente da variação em sua composição química, ou do número de passos de aplicação,

estudos têm demonstrado que estes sistemas adesivos são incapazes de penetrar em toda extensão de fibrilas desmineralizadas, deixando-as desprotegidas e susceptíveis à degradação hidrolítica com o passar do tempo (Pashley et al., 1993; Sano et al., 1994).

2.2.2 Técnica autocondicionante

Ao contrário da primeira, não utiliza um ácido separadamente para o condicionamento do substrato. A primeira etapa consiste da aplicação de um primer ácido, que não requer a lavagem e secagem do substrato, simplificando a técnica e levando a uma menor possibilidade de erros de aplicação. Em seguida, é aplicado o adesivo que, depois de polimerizado, resultará na camada híbrida.

A discrepância entre a dentina condicionada e infiltrada é minimizada, uma vez que teoricamente, os monômeros ácidos de sua composição são capazes de desmineralizar e, simultaneamente, infiltrar a dentina em toda sua profundidade, evitando a degradação hidrolítica relatada com os adesivos do tipo condicione e lave. Entretanto, sinais de nanoinfiltração também têm sido relatados na literatura para os adesivos autocondicionantes, especialmente os de passo único (Tay et al., 2002a; Carvalho et al., 2005; Breschi et al., 2008). A profundidade de dentina desmineralizada/infiltrada está relacionada com a acidez dos monômeros presentes nestes adesivos (De Munck et al., 2005b; Sarr et al., 2010).

De acordo com sua acidez, estes adesivos podem ser classificados como fortes ($\text{pH} \leq 1$), intermediários ($\text{pH} \sim 1,5$), fracos ($\text{pH} \geq 2$) (Van Meerbeek et al., 2003) e ultrafracos ($\text{pH} \sim 2,5$) (Koshiro et al., 2006). Exceto pelos adesivos classificados como “forte”, que desmineralizam a dentina similarmente ao condicionamento ácido, os demais promovem um condicionamento parcial sem expor totalmente as fibrilas colágenas,

deixando uma porção de hidroxiapatita ao seu redor (Sarr et al., 2010; Van Meerbeek et al., 2011).

Além da retenção micromecânica resultante da penetração do adesivo na superfície condicionada, a presença de monômeros funcionais em sua composição, como 10-MDP, 4-META e phenyl-P, vão contribuir de maneira significativa para a união química adicional com os cristais de cálcio da hidroxiapatita remanescente (Yoshida et al., 2004; Van Meerbeek et al., 2011).

Da mesma maneira que aconteceu para os adesivos do tipo condicione e lave, pela tendência de simplificação da técnica, os fabricantes agruparam o primer ácido e o adesivo em um único frasco, resultando nos adesivos “autocondicionantes de 1 passo” ou também conhecidos como “autocondicionantes de passo único”. Estudos demonstram que estes adesivos apresentam uma interação menos efetiva com o substrato e menores valores de resistência de união quando comparados com seu similar de 2 passos (Peumans et al., 2005; Sarr et al., 2010; Cardoso et al., 2011).

Diferentemente da técnica condicione e lave, nesta técnica autocondicionante a camada de esfregação não é removida, mas sim dissolvida pelos monômeros ácidos e incorporada à camada híbrida. Desta maneira, o tipo de preparo pode influenciar na efetividade destes adesivos devido às diferenças na formação da camada de esfregação resultantes da técnica de preparo cavitário utilizada (Freitas PM et al., 2007; Cardoso et al., 2008b; Moretto et al., 2010; Van Meerbeek et al., 2011).

Estudos sugerem que uma camada espessa de esfregação pode levar a menores valores de resistência de união, especialmente para os adesivos autocondicionantes de passo único (Koibuchi et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Sattabanasuk et al., 2007; Ermis et al., 2008).

Além da presença da camada de esfregação, a qualidade do substrato após o preparo, também tem demonstrado ser um fator de fundamental

importância para a qualidade da interface adesiva e longevidade das restaurações (Perdigao, 2010b; Cardoso et al., 2011).

2.3 ADESÃO AOS TECIDOS DUROS DENTAIS

A hibridização dos substratos dentais, com adesivos com diferentes composições químicas e técnicas de aplicação, resulta na formação de camadas híbridas com morfologia e propriedades mecânicas diferentes (Tay et al., 2003; Breschi et al., 2008; Cardoso et al., 2011).

O substrato comumente utilizado nos estudos laboratoriais de adesão ao substrato dentinário é a dentina plana, lixada e sadia. Embora este seja um substrato padronizado, de fácil obtenção e que facilite a comparação com outros estudos, este substrato difere química e mecanicamente daquele encontrado clinicamente após a confecção de um preparo subsequente à remoção de cáries (Wang et al., 2007; Perdigao, 2010b; Cardoso et al., 2011). Seguindo o conceito de Mínima Intervenção, é comum encontrarmos hoje em dia, cavidades com porções remanescentes de cáries ou dentina afetada após um preparo conservador (de Almeida Neves et al., 2011). Estudos revelam que a adesão ao substrato modificado por cárie apresenta menores valores de resistência de união, quando comparado com o substrato “padrão” de testes laboratoriais, com a formação de uma camada híbrida mais espessa devido à penetração dos monômeros resinosos neste substrato poroso e hipomineralizado, além de alteração nas características do colágeno remanescente (Wang et al., 2007; Erhardt et al., 2008; Wei et al., 2008). As características do substrato após remoção do tecido cariado estão relacionadas com a técnica utilizada no processo de remoção de cárie e preparo cavitário (Neves et al., 2011).

Dentre as técnicas alternativas ao uso de instrumentos cortantes rotatórios para a remoção do tecido dental mineralizado, podemos citar os lasers de érbio, também conhecidos como lasers de pulsos longos. Com parâmetros utilizados para a realização de preparos cavitários, os lasers de érbio provocam microexplosões na estrutura irradiada removendo o tecido desejado (Hibst, 1992; Eversole; Rizoiu, 1995). A ação destes lasers sobre uma estrutura mineralizada varia de acordo com a quantidade de água presente no substrato (Li et al., 1992). Assim, o limiar de ablação para a dentina cariada é menor do que para a dentina sadia, devido à maior quantidade de água presente naquele tecido, resultando na remoção seletiva do tecido cariado.

Os padrões morfológicos da interface adesiva das superfícies irradiadas com estes lasers dependem do sistema adesivo utilizado e dos parâmetros de irradiação (Bader; Krejci, 2006; Aranha et al., 2007). Em geral, os prolongamentos de resina apresentam-se com uma textura rugosa devido a penetração do adesivo nas trincas da subsuperfície, resultante do efeito termomecânico da ablação com os lasers de pulsos longos (Moretto et al., 2011). Como resultado dos efeitos termomecânicos promovidos pelos lasers de pulsos longos também é reportada a denaturação das fibrilas colágenas (Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011). O remanescente de fibrilas colágenas fusionadas dificulta a penetração do adesivo, criando locais em potencial para degradação hidrolítica da camada híbrida, comprometendo a qualidade e resistência de união (Ceballos et al., 2002).

A adequada difusão dos monômeros resinosos nos espaços interfibrilares é de fundamental importância para a qualidade e longevidade da interface adesiva (Breschi et al., 2008). A literatura apresenta resultados bastante controversos no que diz respeito aos estudos com os lasers de érbio e seus efeitos na resistência de união aos tecidos irradiados em longo prazo (do Amaral et al., 2008; de Oliveira et al., 2012). Com relação à adesão aos substratos irradiados com os lasers

de pulsos ultracurtos, a escassez de trabalhos na literatura não nos permite fazer afirmações consistentes. Os poucos estudos disponíveis verificaram valores de resistência de união para os adesivos autocondicionantes e condicione e lave de 2 passos, semelhantes aos obtidos com o grupo sem irradiação, demonstrando a tendência dos lasers de pulsos ultracurtos em preservar o substrato irradiado, permitindo uma interação adequada com os sistemas adesivos modernos (Bello-Silva Marina Stella, 2010; Gerhardt-Szep et al., 2012).

Independentemente da qualidade do substrato e da técnica de hibridização realizada, parece existir um consenso de que a união entre a dentina e o sistema adesivo se degrada com o tempo (Okuda et al., 2002; Reis AF et al., 2004; De Munck et al., 2011; Hass et al., 2012; Mobarak; Daifalla, 2012). A maioria dos sistemas adesivos apresentam resultados favoráveis em termos de retenção e selamento das interfaces adesivas nos testes em curto prazo. Entretanto, esta efetividade tem sido questionada com relação à durabilidade e qualidade da união após certo período de armazenamento (Breschi et al., 2008; De Munck et al., 2012).

Nas simulações da degradação em longo prazo, o armazenamento em água tem se mostrado um método eficiente nos testes em laboratório, tanto para os testes de adesão (Carrilho et al., 2004; Reis A et al., 2004; Reis AF et al., 2010) quanto para a análise da degradação da camada híbrida através da nanoinfiltração (Okuda et al., 2002; Tay et al., 2003; Reis AF et al., 2004; Reis AF et al., 2010). Amostras armazenadas em óleo resultaram em menor degradação da interface adesiva e valores de resistência de união, denotando que a água desempenha um papel fundamental na degradação hidrolítica da interface adesiva (Tay et al., 2003; Carrilho et al., 2004; Reis AF et al., 2010).

Idealmente, um sistema adesivo deve oferecer um adequado selamento e resistência de união à superfície dentinária, além de ser duradouro. Diferenças na hidrofiliabilidade e conteúdo de água representam um papel importante na degradação da camada híbrida e padrões de

nanoinfiltração apresentado pelos adesivos. Adesivos com simplificada técnica de aplicação, no qual primer e adesivo são misturados no mesmo frasco, tendem a apresentar maiores índices de nanoinfiltração devido à sua alta hidrofilicidade (Yiu et al., 2004; Cardoso et al., 2011).

As razões que contribuem para a degradação da camada híbrida podem ser atribuídas a uma difusão insuficiente dos monômeros resinosos, alta permeabilidade da interface adesiva, separação de fase, polimerização insuficiente do adesivo e ativação de enzimas endógenas colagenolíticas (Breschi et al., 2008). Além disso, a degradação da interface de união pode estar relacionada com a degradação dos polímeros resinosos presentes nos materiais restauradores (Ferracane, 2006).

Tão importante quanto testar a resistência de união aos tecidos, é avaliar a qualidade desta união em longo prazo. A qualidade da interface adesiva é o fator de maior importância na longevidade da restauração adesiva. Os mecanismos de degradação ainda não foram completamente entendidos, mas sabe-se que uma ótima interação entre o sistema adesivo e o substrato é fundamental para se alcançar a longevidade da restauração.

Devido às vantagens de utilização dos lasers de pulsos ultracurtos, como eficiente taxa de ablação e precisão com mínimo dano aos tecidos adjacentes, cada vez mais o uso destes lasers tem sido incentivado em diversas áreas além da engenharia, como medicina, especialmente em oftalmologia, e odontologia. Assim, avaliar as características dos substratos irradiados com os lasers de pulsos ultracurtos e verificar a qualidade de união e estabilidade, imediato e em longo prazo, das restaurações realizadas sobre as superfícies irradiadas com estes lasers se fazem necessários para um maior entendimento desta tecnologia e sua futura aplicação clínica.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* tem por objetivos:

1. Avaliar morfológica e ultramorfolologicamente os efeitos da irradiação com laser de femtossegundos (fs) na superfície e subsuperfície dentinária.
2. Comparar a resistência de união de diferentes sistemas adesivos à dentina irradiada com um laser de pulsos ultracurtos e preparada com ponta diamantada após 1 semana e 6 meses de armazenamento em água.
3. Avaliar os efeitos da irradiação com laser de pulsos ultracurtos na formação da interface de união entre a dentina e os diferentes sistemas adesivos.
4. Avaliar a degradação da interface adesiva da superfície dentinária irradiada restaurada com diferentes sistemas adesivos, após 1 semana e 6 meses de armazenamento em água.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados dentes terceiros molares humanos cedidos pelo Banco de Dentes da Universidade Católica de Leuven com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) - (Anexo A).

Foram utilizados dentes recém-extraídos ou armazenados sob refrigeração em solução aquosa de cloramina a 0,5% por um período máximo de dois meses após a data de extração. Para remoção dos debris orgânicos, os dentes foram submetidos à raspagem manual com cureta periodontal (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA).

4.1 TESTE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO: MICROTRAÇÃO

Para esta etapa foram utilizados 60 dentes. Após a limpeza, a parte radicular dos dentes (até a junção cimento-esmalte) foi embutida em gesso pedra a partir de um molde de silicone pré-fabricado de modo que a parte coronária do dente ficasse totalmente exposta.

Para a exposição das superfícies oclusais, os dentes embutidos em gesso foram fixados a um dispositivo acoplado a uma cortadeira de alta precisão (Isomet 1000; Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) com um disco diamantado (11-4254; Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA). O corte foi realizado na altura do sulco principal obtendo-se uma superfície dentinária planificada de profundidade média. Os dentes foram observados em lupa estereoscópica (MSA 166305; Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Suíça) para a verificação de possíveis remanescentes de esmalte e, caso necessário, foram novamente acoplados à cortadeira para um corte adicional.

Os dentes foram, então, aleatoriamente divididos entre os grupos experimentais ($n=10$), sendo 2 tratamentos de superfície (ponta diamantada ou laser de femtossegundos) restaurados com 3 adesivos dentinários diferentes: condicione e lave de 3 passos, autocondicionante de 2 passos e autocondicionante de 1 passo.

4.1.1 Preparo com Ponta diamantada

Para o tratamento de superfície com ponta diamantada, os dentes foram acoplados a um dispositivo do aparelho formador de microespécimes (MicroSpecimen Former; Universidade de Iowa, IA, EUA) de modo que as superfícies oclusais ficassem paralelas a uma ponta diamantada cilíndrica de granulação média ($100\ \mu\text{m}$) (modelo 842; Komet, Lemgo, Alemanha) acoplada a um motor de alta rotação (KAVO, Biberach, Alemanha), fixado ao mesmo equipamento (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Preparo da amostra com a ponta diamantada

Todos os dispositivos utilizados eram padronizados para o encaixe da base de gesso, facilitando o paralelismo entre a superfície recém-cortada e a ponta diamantada.

Estas superfícies dentinárias foram desgastadas com a ponta diamantada por 30 segundos sob constante irrigação com água e, ao final do tratamento, foi possível observar um desgaste homogêneo de toda superfície dentinária.

4.1.2 Preparo com Laser de Femtossegundos (fs)

Para o tratamento de superfície com o laser de fs (10^{-15} s) as superfícies dentinárias foram irradiadas com uma fonte de laser com comprimento de onda de 1.045 nm (FCPA μ Jewel; IMRA America Inc, MI, EUA) e largura de pulso de aproximadamente 500 fs. O laser pertence ao Instituto Fraunhofer de Tecnologia a Laser (ILT, Aachen, Alemanha).

Para a irradiação, as amostras foram posicionadas em uma placa de petri com água destilada, para evitar ao máximo a desidratação, e posicionadas sobre a mesa de irradiação do equipamento (Figura 4.2).

O foco foi ajustado antes de cada irradiação e ajustes finos foram realizados durante o procedimento de irradiação, pois no modo desfocado, o laser perde parcialmente sua eficiência de ablação. Para o foco do feixe, uma objetiva (5x/0, 15, Epiplan-Neofluar, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi acoplada ao scanner resultando em um feixe de 8,8 μ m de diâmetro; assim, a distância entre as linhas de varredura do scanner foi determinada em 8 μ m. O scanner foi programado para a velocidade máxima de escaneamento correspondente a 400 mm/s. A potência média utilizada foi de 0,3 W e a taxa de repetição de 100.000 Hz. A densidade de energia foi de 4,9 J/cm².

Para a confecção da cavidade as irradiações foram realizadas no modo de varredura, alternadas nos eixos X e Y, totalizando 20 repetições para cada eixo e resultando em uma cavidade de aproximadamente 4 x 4 x 1 mm na região central do dente.

Figura 4.2 – Irradiação com o laser de fs (1.045nm)

Antes de iniciar o procedimento de irradiação das amostras, a potência dos lasers foi aferida por um medidor de potência para uma aferição precisa da potência de saída do feixe.

4.1.3 Restauração das amostras

Para a realização do ensaio de microtração foram utilizados 3 sistemas adesivos (Tabela 4.1) e (Figura 4.9), aplicados sobre as superfícies de acordo com as recomendações dos fabricantes, como descrito a seguir:

Tabela 4.1 – Composição química, lote e classificação dos adesivos testados.

Adesivo	Fabricante	pH	Composição	Classificação
Optibond FL (OFL) <u>Lote:</u> Ácido # 3034827 Primer # 3457744 Adesivo # 3461592	Kerr, Orange, EUA	1,9	<u>Ácido:</u> ácido fosfórico a 37,5% e sílica <u>Primer:</u> HEMA, GPDM, MMEP, água, álcool, CQ, BHT	Condicione e lave de 3 passos
		6,9	<u>Adesivo:</u> Bis-GMA, HEMA, GDMA, CQ, ODMAB e partículas de carga (SiO ₂ , bário, aluminoborosilicato, Na ₂ SiF ₆)	
Clearfil SE Bond (CSE) <u>Lote:</u> Primer # 01429A Adesivo # 00964B	Kuraray, Tóquio, Japão	1,9	<u>Primer:</u> 10-MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, CQ, N,N-dietanol p-toluidina e água <u>Adesivo:</u> 10-MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilado hidrofóbico, CQ, N,N-dietanol p-toluidina e sílica coloidal silanizada	Autocondicionante de 2 passos
G-aenial Bond (GAB) <u>Lote:</u> # 1012181	GC, Tóquio, Japão	1,5	4-META, monômeros esters de ácido fosfórico, monômeros dimetacrilatos, água, acetona, dióxido de silicone e fotoiniciadores	Autocondicionante de passo único

Abreviações: 4-META, ácido 4-metacriloxietiltrimelítico; 10-MDP: 10-metacriloloxidecil fostato dihidrogênio; Bis-GMA, bisfenol A diglicidil metacrilato; BHT, butilidroxitolueno; CQ, canforoquinona; DMA, dimetacrilato; GDMA, glicerol dimetacrilato; GPDM, glicerol fosfato dimetacrilato; HEMA, 2-hidroximetil metacrilato; MMEP, mono-2-metacriloioloxietil ftalato; ODMAB, 2-(etilexil)-4-(dimetilamino)benzoato; phA-m, monômero ácido fosfórico.

- Optibond FL (Kerr, Orange, CA, EUA) – Adesivo condicione e lave de 3 passos: A superfície dentinária foi condicionada com ácido fosfórico a 37,5% por 15 segundos (s), lavada pelo mesmo período de tempo e gentilmente seca com jato de ar por 5 s sem desidratar a amostra. O primer foi aplicado com o auxílio de um pincel descartável, esfregando-se levemente na superfície dentinária por 20 s seguido de um jato de ar de 3 s. Uma fina camada de adesivo foi, então, aplicado utilizando-se o mesmo pincel descartável esfregando-se levemente por 20 s, seguido de um jato de ar por 3 s. A polimerização do adesivo foi feita por 20 s utilizando-se uma fonte de luz LED (Bluephase; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) com intensidade de luz de 1200 mW/cm².

- Clearfil SE Bond (Kuraray, Tóquio, Japão) – Adesivo autocondicionante de 2 passos: O primer foi aplicado na superfície durante 20 s (de forma passiva), seguido de um jato de ar de 3 segundos para evaporação do solvente. O adesivo foi aplicado seguido imediatamente de um jato de ar de 3 s para homogeneização da camada de adesivo e fotopolimerizado por 10 s.

G-aenial Bond (GC, Tóquio, Japão) – Adesivo autocondicionante de 1 passo: O adesivo foi aplicado sobre a superfície dentinária e deixado em repouso por 10 s. Em seguida, um jato de ar com intensidade máxima da seringa tríplice foi direcionado perpendicularmente à superfície, a uma distância aproximada de 2 mm da amostra, durante 5 s, seguido de fotopolimerização por 10 s.

4.1.4 Teste de resistência adesiva

Após o procedimento adesivo, a resina composta (Z100; 3M ESPE, Sant Paul, MN, EUA) foi aplicada em incrementos de cerca de 2 mm,

fotopolimerizados por 40 s. Um bloco de aproximadamente 5 mm de altura foi construído sobre a dentina hibridizada.

Após um período de 24 h de armazenamento em água destilada a 37°C, as amostras foram levadas à máquina de corte (Accutom-50; Struers, Ballerup, Dinamarca) para cortes seriados no sentido mésio-distal e vestibulo-lingual, perpendiculares à interface adesiva, sob constante refrigeração com água, de modo a se obter corpos de prova em forma de palito com dimensões de aproximadamente 1 X 1 mm (Figura 4.3).

Somente 2 palitos foi perdidos durante o manuseio das amostras, pois caíram no chão durante sua manipulação e foram desprezados, não sendo considerados no estudo. Todos os palitos obtidos após o corte foram observados em lupa estereoscópica (MSA 166305; Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Suíça) em aumento de 50X para a verificação de possíveis falhas ou remanescente de esmalte para os palitos da periferia.

Figura 4.3 – Palitos obtidos para o teste de microtração, após o corte seriado das amostras

Os corpos de prova selecionados, foram cuidadosamente divididos em 2 blocos respeitando-se a posição de cada palito – central ou periferia. Metade dos palitos foram submetidos ao teste de microtração e a outra metade armazenada em solução aquosa de cloramina a 0,5% e testados após 6 meses.

Para o teste de microtração, os palitos foram fixados individualmente em dispositivos de Ciucchi com cola de cianocrilato em gel (Model Repair II Blue; Dentsply, Tochigi, Japão) e tracionados em uma máquina de ensaios universais (LRX; Loyd, Hampshire, Inglaterra) a uma velocidade de 1 mm/min com uma célula de carga de 100 Newtons (N).

A sequência de preparo das amostras para o teste de microtração está ilustrada a seguir (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Esquema ilustrativo do teste de microtração

Após o teste de microtração, os espécimes fraturados foram observados em lupa estereoscópica com aumento de 50X para análise do padrão de fratura e classificados como: Adesivas (rompimento apenas na interface adesivo/dentina); Coesivas em dentina (rompimento da

estrutura dentinária); Coesivas em resina composta (rompimento na resina composta) e Mista (presença de falha adesiva e falha coesiva em dentina e/ou resina composta).

Os valores obtidos durante o teste de microtração foram gerados em N e transformados em Mega Pascal (MPa), dividindo-se a força atingida no momento da fratura (N) pela área da interface adesiva (mm²). A área de secção transversal dos corpos-de-prova foi medida com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Belgium NV; Kruibeke, Bélgica).

Para avaliação das diferenças ente os dados obtidos no teste de microtração foi construído um modelo linear de efeitos mistos utilizando o programa estatístico R 2.13.2 e o pacote nlme (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria), que levou em consideração o dente que originou cada espécime (palito). Neste modelo todos os fatores investigados e suas primeiras ordens de interação foram incluídos. Para análise adicional das interações entre os fatores de estudo, contrastes específicos foram calculados utilizando o pacote multcomp. Todos os testes foram realizados com o nível de significância de $\alpha=0,05$.

4.1.5 Análise do Padrão de Fratura em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Além do padrão de fratura de todos os espécimes ter sido analisado em lupa estereoscópica, 3 amostras escolhidas aleatoriamente de cada grupo foram processadas para MEV, tanto para o lado em resina, como para o lado em dentina, a fim de ilustrar os tipos de fraturas em cada grupo e facilitar o entendimento dos modos de falhas ocorridos. Para isso, os palitos foram montados em *stubs* e armazenados em estufa a 37° C por 24 horas. Após o recobrimento das amostras com ouro,

eletromicrografias da ordem de 80x e 300x foram obtidas das regiões mais representativas.

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE

A análise da superfície e subsuperfície para os dois tipos de preparo cavitário foi realizado em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).

Para esta etapa foi utilizado um total de 6 dentes ($n=3$), que tiveram sua porção oclusal removida com o auxílio de um disco diamantado. Em seguida, um segundo corte foi realizado bem ao centro do dente no sentido méso-distal, resultando em hemi-discos de dentina circundados por esmalte com aproximadamente 3 mm de espessura, totalizando 12 amostras ($n=6$) para avaliação em MEV e MET.

4.2.1 MEV

Para esta etapa foram utilizadas 6 amostras ($n=3$) aleatoriamente distribuídas para o preparo das superfícies com ponta diamantada ou laser de fs. Em seguida, foi realizada uma ranhura na face pulpar para auxiliar na clivagem das amostras no momento do preparo para a observação no MEV. As superfícies oclusais foram clivadas no sentido vestibulo-lingual a partir da ranhura realizada previamente, de modo a possibilitar uma análise transversal da superfície dentinária (Figura 4.5).

As amostras foram imersas imediatamente em solução de glutaraldeído 2,5% por 24 h, lavadas consecutivamente com 3 banhos de 20 minutos cada em solução tampão cacodilato 0,2 M, seguido de 1 banho em água destilada por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram

desidratadas em concentrações crescentes de etanol (25%, 50 e 75% por 20 min; 95% por 30 min e 100% por 60 min).

Após o processo de desidratação, as amostras foram secas quimicamente em HMDS por 10 minutos e secas sobre papel absorvente na capela por 12 h. Em seguida, as 2 metades de cada amostra foram montadas em *stubs* de alumínio; uma metade foi utilizada para a análise de superfície e a outra para análise da subsuperfície (transversal), seguidas de recobrimento com ouro por 50 segundos (Sputtering Device 07-120; Balzers Union, Liechtenstein) (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Amostras de dentina para análise de superfície e subsuperfície em MEV

Para análise morfológica da superfície dentinária, eletromicrografias com magnificação da ordem de 1.000X e 5.000X foram obtidas das regiões mais representativas das superfícies preparadas com ponta diamantada e laser de fs. Para a análise da subsuperfície, foram realizadas eletromicrografias com magnificação da ordem de 2.000X e 10.000X das regiões mais representativas de cada amostra.

4.2.2 MET

Para esta etapa foram utilizadas 6 amostras (n=3) aleatoriamente distribuídas para o preparo das superfícies com ponta diamantada ou laser

de fs. Cada hemi-disco recebeu 3 cortes em sua porção central, equidistantes 1,1 mm entre si, resultando em 2 palitos com aproximadamente 0,8 mm de largura e 1,5 mm de espessura (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Amostras de dentina para análise de superfície e subsuperfície em MET

Um palito de cada amostra foi armazenado em solução aquosa de cloramina a 0,5% para processamento após 6 meses e os demais, imersos em solução ácida de formaldeído a 10% (Gooding and Stewart Fluid, Prosan, Guent, Bélgica) durante 36 h para desmineralização.

As amostras foram, então, lavadas com 3 banhos de 1 min em água destilada e imersos em solução de glutaraldeído 2,5% por 24 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas, consecutivamente, com 3 banhos de 20 minutos cada em solução tampão cacodilato 0,2 M, seguido de 1 banho em água destilada por 1 minuto e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (25%, 50%, 75%, 95% e 100%) através de 2 banhos de 10 minutos em cada concentração. Em seguida, as amostras foram imersas em 3 banhos de 10 minutos em óxido de propileno a 100% e realizada a infiltração da resina (Dr Spurr; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) por 12 h em agitador. Foi realizada a inclusão dos espécimes na resina e polimerização em estufa seca a 37°C por 24 h.

Cada amostra (hemi-disco de dentina) permitiu a obtenção de 2 blocos, totalizando 6 blocos por grupo. Dois blocos de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente para o corte das secções ultrafinas de 70 nm de espessura com o auxílio de uma navalha de diamante (ultra 45°; Diatome AG, Biel, Suíça) montada em um ultramicrotomo (Ultracut UCT; Leica, Viena, Áustria). As secções foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão, operando em 80 kV, (JEM-1200 EX II; JEOL, Tóquio, Japão). Eletromicrografias com magnificação da ordem de 6.000X e 20.000X foram obtidas da superfície irradiada e da região imediatamente inferior.

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA INTERFACE DE UNIÃO

Para esta etapa foram utilizados 18 dentes. Metade das amostras foi preparada com a ponta diamantada e a outra metade com o laser de fs. Em seguida, as amostras de cada tipo de preparo foram aleatoriamente divididas em 3 grupos e restauradas, de acordo com as recomendações dos fabricantes, utilizando os 3 sistemas adesivos dentinários avaliados neste estudo (Tabela 4.1) e (Figura 4.8). Uma fina camada de resina flow (Protect Liner F; Kuraray, Tóquio, Japão) de aproximadamente 1,0 mm de altura foi aplicada sobre a superfície dentinária hibridizada e fotopolimerizada por 40 s.

Após armazenamento em ambiente úmido por 24 h, as amostras foram seccionadas na porção central da restauração no sentido mesio-distal resultando em 2 porções semelhantes, totalizando 36 amostras. Deste total, metade das amostras foi utilizada para avaliação em MEV e a outra metade em MET.

4.3.1 MEV

Para esta etapa foram utilizadas 18 amostras ($n=3$), que foram incluídas em resina epóxica para auxiliar no processo de polimento da interface (Figura 4.7).

O polimento foi realizado com lixas de SiC # 240, 320, 400, 600, 1.200, 4.000 com irrigação constante por 30 segundos e com feltro e solução diamantada de 3 μm (Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA), montados em politriz.

Após lavagem com água destilada em ultrassom por 10 min, as amostras foram imersas em solução aquosa de ácido clorídrico 5 M por 10 segundos, lavadas cuidadosamente com água destilada e colocadas em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos. Ao final deste processo, as amostras foram lavadas novamente com água destilada, fixadas em glutaraldeído por 24 h, desidratadas e cobertas com ouro como descrito anteriormente (seção: 4.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE - **4.2.1 MEV**).

Eletromicrografias com magnificação da ordem de 2.000X foram obtidas das regiões mais representativas das amostras.

Figura 4.7 – Amostras de dentina para análise da interface adesiva em MEV e MET

4.3.2 MET – Nanoinfiltração

Para esta etapa foram utilizadas 18 amostras (n=3). Cada hemidisco recebeu 3 cortes em sua porção central, equidistantes 1,1 mm entre si, resultando em 2 palitos com aproximadamente 0,8 mm de largura e 1,5 mm de espessura (Figura 4.7).

As amostras foram imersas em solução de nitrato de prata amoniacal em ambiente fechado e sem luz por 24 h e em seguida, imersas em solução reveladora sob luz fluorescente por 8 h para revelação dos íons de prata em grãos metálicos.

As amostras foram, então, lavadas com 3 banhos de 1 min em água destilada e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% por 24 h. As etapas seguintes de processamento para MET foram realizadas como descrito anteriormente na seção: 4.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE - **4.2.2 MET**, sem a etapa de desmineralização dos espécimes.

Figura 4.8 – Fluxograma dos grupos de tratamento para Microtração e Nanoinfiltração. T1: 1 semana; T2: 6 meses

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO: MICROTRAÇÃO

A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram verificadas através do histograma plot.

Gráfico 5.1 – Histograma plot evidenciando a distribuição normal dos dados

Verificadas a normalidade e homogeneidade das variâncias, foi construído um modelo linear de efeitos mistos utilizando o programa estatístico R 2.13.2 e o pacote nlme (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria), levando em consideração o dente que originou cada espécime. Neste modelo todos os fatores investigados e suas primeiras ordens de interação foram incluídos. Para análise adicional das interações entre os fatores de estudo, contrastes específicos foram calculados utilizando o pacote multcomp. Todos os testes foram realizados com o nível de significância de $\alpha=0,05$. A análise dos fatores e suas interações estão descritos no Apêndice A.

Com base na análise estatística, foi verificado que houve diferença estatisticamente significativa para os fatores *tempo de armazenamento* e *adesivo* ($p < 0,0001$), mas não para o fator *método de preparo* ($p = 0,5126$).

As interações *adesivo* x *tempo de armazenamento* ($p = 0,1569$) e *adesivo* x *método de preparo* ($p = 0,103$) não foram significativas. No entanto, a interação *tempo de armazenamento* x *método de preparo* foi significativa ($p < 0,0001$).

Os gráficos 5.2 e 5.3 mostram uma representação esquemática dos dados expressos em valores de média e desvio padrão (DP) obtidos no teste de microtração. É possível observar que todos os sistemas adesivos apresentaram uma redução da resistência de união após 6 meses de armazenamento para os 2 métodos de preparo testados.

Gráfico 5.2 – Representação gráfica dos valores obtidos no teste de microtração para todas as variáveis avaliadas. No gráfico de box plot, os retângulos representam 50% dos valores e a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana. Os valores entre os traços representam 80% dos valores. PD: Ponta diamantada; Fs L: Laser de femtossegundos; T1: 1 semana; T2: 6 meses

Gráfico 5.3 – Representação gráfica dos valores obtidos no teste de microtração para todas as variáveis avaliadas

A tabela 5.1 mostra os resultados obtidos para a análise estatística do efeito do método de preparo da superfície para cada tempo de armazenamento e sistema adesivo através dos dados expressos em valores de média e desvio padrão (DP) obtidos no teste de microtração.

Tabela 5.1 - Médias (MPa) e desvio padrão (DP) dos valores de resistência de união obtidos no teste de microtração e número espécimes por grupo (n)

Adesivo	Tempo de armazenamento	Método de Preparo		Valor de p
		Ponta diamantada	Laser	
OFL	1 semana	67,2 ± 14,6 n=64	62,9 ± 11,3 n=20	0,9999
	6 meses	50,5 ± 15,7 n=61	42,1 ± 12,6 n=20	0,0541
CSE	1 semana	53,1 ± 11,7 n=72	61,0 ± 20,1 n=19	0,3096
	6 meses	40,8 ± 14,1 n=61	37,0 ± 17,9 n=20	0,9431
GAB	1 semana	43,1 ± 14,9 n=62	56,7 ± 10,7 n=20	0,0239
	6 meses	26,5 ± 13,0 n=54	25,4 ± 11,2 n=19	0,9903

Como mencionado anteriormente, a interação *adesivo x método de preparo* não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Contudo, a análise linear de efeitos mistos mostrou que, comparando-se os 2 métodos de preparo cavitário nos testes de resistência adesiva realizados após 1 semana de armazenamento, o adesivo autocondicionante de passo único GAB apresentou valores estatisticamente superiores quando aplicado em dentina preparada com laser ($p=0,0239$). Os demais adesivos não diferiram estatisticamente com relação ao tipo de preparo realizado independentemente do tempo de armazenamento considerado.

O gráfico 5.4 mostra os valores de médias e intervalo de confiança para cada grupo avaliado. Diferenças estatisticamente significativas podem ser observadas quando não existe intersecção entre os intervalos de confiança, nesse gráfico representado pelos *wiskers* em cada grupo.

Assim, podemos notar que os valores de resistência adesiva dos 3 sistemas adesivos à dentina preparada com ponta diamantada apresentaram o mesmo comportamento, independente do tempo armazenamento (1 semana ou 6 meses); o adesivo GAB apresentou valores semelhantes ao adesivo CSE, mas estatisticamente inferiores quando comparado ao OFL.

Modelo Linear de efeitos mistos

Gráfico 5.4 – Predição das médias (MPa) e intervalos de confiança do teste de resistência de união para todas as variáveis avaliadas. PD: Ponta diamantada; L: Laser de femtossegundos; T1: 1 semana; T2: 6 meses

Ao avaliar as superfícies preparadas com o laser de fs para os mesmos adesivos, verificou-se que os valores de resistência adesiva foram semelhantes com o padrão observado com a ponta diamantada, exceto pelo adesivo GAB, que não diferiu estatisticamente quando comparado com o OFL (Gráfico 5.4).

Nenhuma falha pré-teste ocorreu para os 12 grupos testados. O número de espécimes testados por grupo está descrito na tabela 5.1. Os resultados da análise do padrão de fratura das amostras em cada grupo estão representados no gráfico 5.5.

Gráfico 5.5 - Análise do padrão de fratura das amostras após o teste de microtração

A análise do padrão de fraturas revelou um aumento do número de fraturas mistas após 6 meses, para todos os sistemas adesivos testados com ambos os tipos de preparo cavitário, concomitantemente com uma diminuição do número de fraturas adesivas e coesivas em dentina.

O gráfico 5.5 mostra que cada sistema adesivo apresentou padrões semelhantes de fraturas para os 2 tipos de preparo cavitário testados, independentemente do tempo de armazenamento. Os adesivos OFL e CSE apresentaram uma maior quantidade de fraturas coesivas em dentina quando comparados com o autocondicionante de passo único (GAB) para os 2 tempos de avaliação.

A figura 5.1 ilustra o padrão de fratura mista observada para os grupos preparados com ponta diamantada, restaurados com o adesivo autocondicionante de 2 passos (CSE) e testado após 1 semana de armazenamento. É possível observar fraturas coesivas na dentina e no compósito, entremeados pelo adesivo e uma parte da região superior da camada híbrida. O mesmo padrão de fraturas mistas ocorreu para o adesivo condicione e lave de 3 passos (OFL).

Figura 5.1 - Eletromicrografias obtida em MEV: Falha classificada como mista em amostra preparada com ponta diamantada e restaurada com o adesivo CSE após 1 semana de armazenamento (a) Lado da dentina - aumento de 80X; (b) Lado da dentina - aumento de 300X. (c) Lado do compósito - 80X; (d) Lado do compósito- aumento de 300X. Setas: Prolongamentos de resina; A: Adesivo; D: Dentina; C: Compósito; CH: Camada Híbrida

A figura 5.2 ilustra o padrão de fratura adesiva para os grupos preparados com ponta diamantada e restaurados com o adesivo autocondicionante de passo único (GAB) após 6 meses de armazenamento.

Figura 5.2 - Eletromicrografias obtidas em MEV: Falha classificada como adesiva em amostra preparada com ponta diamantada e restaurada com o adesivo GAB após 6 meses de armazenamento (a) Lado da dentina – aumento de 80X; (b) Lado da dentina - aumento de 300X. (c) Lado do compósito – 80X; (d) Lado do compósito- aumento de 300X. Setas: Bolhas na camada de adesivo. A: Adesivo; D: Dentina; CH: Camada Híbrida

Em geral, as fraturas para este adesivo ocorreram na base de camada híbrida, e, nas micrografias em MEV, é possível observar as ranhuras promovidas pela ponta diamantada durante o preparo. Em maior aumento é possível observar porções da camada híbrida destacadas durante o teste de microtração e que ficaram aderidas à porção do compósito, bem como a presença de prolongamento de resina destacados da dentina. As setas indicam bolhas na camada de adesivo.

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE

5.2.1 MEV

Os 2 tipos de preparo testados neste estudo resultaram em padrões morfológicos dentinários bem distintos. As figuras 5.3 a 5.6 mostram os padrões morfológicos em MEV das superfícies e subsuperfícies obtidos após os preparos com ponta diamantada e laser de fs.

O preparo cavitário com o laser de fs foi capaz de produzir cavidades precisas, bem delimitadas e com ângulos internos arredondados (Figura 5.3).

A análise morfológica do grupo preparado com ponta diamantada revelou a presença de algumas ranhuras na superfície dentinária, promovidas pela ação da ponta diamantada, completamente cobertas por uma espessa camada de esfregaço obliterando a entrada dos túbulos dentinários (Figuras 5.4a,b, 5.5a,b e 5.6a).

Figura 5.3 - Eletromicrografias obtidas em MEV: Preparo das superfícies dentinárias com laser de fs (0,3W)

Já para o grupo preparado com o laser de fs, apesar da presença de uma camada de debris depositada sobre a superfície dentinária, os túbulos apresentaram-se abertos com a presença de trincas na dentina peritubular (Figuras 5.4c e 5.4d).

Figura 5.4 - Eletromicrografias obtidas em MEV: Características morfológicas das superfícies dentinárias não irradiadas (a,b) e preparadas com laser de fs - 0,3W (c,d). Setas: trincas na dentina peritubular das amostras irradiadas

Uma observação dos cortes transversais da dentina irradiada revelou que tais trincas eram localizadas somente na superfície, os túbulos dentinários se mantinham íntegros em toda sua extensão e conectados com a superfície que se apresentava coberta por uma camada de debris (Figuras 5.5c,d e 5.6b). Eletromicrografias dos grupos preparados com ponta diamantada revelaram um padrão morfológico semelhante para a subsuperfície, no qual os túbulos se apresentam homogêneos e sem sinais de alteração (Figuras 5.5a,b e 5.6a).

Figura 5.5 - Eletromicrografias obtidas em MEV: Secções transversais das superfícies dentinárias não irradiadas (a,b) e preparadas com laser de fs - 0,3W (c,d); SP: *Smear plug*

Figura 5.6 - Eletromicrografias obtidas em MEV ilustrando a diferença do padrão morfológico após irradiação e preparo com ponta diamantada. Secções transversais das amostras de dentina em 2.300X. (a) Ponta diamantada; (b) Laser de fs 0,3 W

5.2.2 MET

As micrografias obtidas em MET mostraram que a irradiação das amostras com o laser de fs resultou em uma camada superficial irregular (Figuras 5.7c-d e 5.8a), diferentemente das amostras preparadas com a ponta diamantada em que a superfície apresentou-se plana e regular (Figuras 5.7a-b e 5.8a). Em alguns casos foi possível observar a presença de remanescentes da camada de esfregaço que foram embutidos durante a inclusão dos espécimes na resina epóxica (Figuras 5.7a-b). Tanto para as amostras preparadas com a ponta diamantada quanto para aquelas preparadas com o laser de fs as fibrilas colágenas foram preservadas.

Para os grupos preparados com ponta diamantada, foi possível observar mais claramente as bandas das fibrilas colágenas organizadas desde a superfície. Já para o grupo irradiado, foi possível observar a integridade das fibrilas de colágeno, mas sem a visualização clara de suas bandas (Figura 5.8).

Figura 5.7 - Eletromicrografias obtidas em MET: Secções transversais da superfície dentinária a) e b) ponta diamantada; c) e d) laser de fs – aumentos de 6.000X e 20.000X

Figura 5.8 - Eletromicrografias obtidas em MET: Secções transversais da superfície dentinária a) ponta diamantada; b) laser de fs – aumento de 50.000X. Setas: Bandas de colágeno

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA INTERFACE DE UNIÃO

5.3.1 MEV

A hibridização das superfícies irradiadas pode ser observada na figura 5.9. A análise em MEV da interface adesiva para os 3 sistemas adesivos avaliados neste estudo revelou uma excelente adaptação com a superfície dentinária preparada com ponta diamantada e laser de fs. Em todos os grupos experimentais a dentina apresentou-se sem alterações e a interação de cada adesivo com o substrato dentinário foi semelhante para ambos os tipos de preparo, exceto pela base da camada híbrida um pouco mais irregular para os grupos preparados com o laser de fs (Figuras 5.9b,d,f). Todos os grupos apresentaram interfaces de união contínua ao longo de toda a interface adesiva.

Para as superfícies restauradas com adesivo OFL foi possível observar claramente a formação de uma camada híbrida homogênea, consistente e bem definida, distinta da camada de adesivo (Figuras 5.9a,b). Já para os adesivos CSE e GAB, apenas a camada de adesivo foi visualizada (Figuras 5.9c-f).

Para todos os grupos foi possível observar uma camada uniforme de adesivo e a presença de prolongamentos de resina resultantes da penetração do adesivo nos túbulos dentinário. Para o adesivo GAB, os prolongamentos de resina apresentaram-se um pouco mais longos para os grupos irradiados quando comparados com o grupo preparado com ponta diamantada (Figura 5.9f).

Figura 5.9 - Eletromicrografias obtidas em MEV: Secções transversais da interface adesiva das amostras não irradiadas e preparadas com laser de fs restauradas com (a,b) Optibond FL; (c,d) Clearfil SE; (e,f) G-aenial Bond – aumento de 2.000X

5.3.2 MET

As figuras 5.10 a 5.12 mostram a análise ultramorfológica para os preparos com ponta diamantada e laser de fs, respectivamente, restaurados com os 3 sistemas adesivos avaliados, após 1 semana e 6 meses de armazenamento. Diferenças na formação da camada híbrida para os diferentes sistemas adesivo foram observadas, independentemente do tipo de preparo cavitário realizado.

A análise em MET mostrou que todos os adesivos avaliados apresentaram um íntimo contato com a superfície dentinária preparada com ponta diamantada ou laser de fs para os 2 tempos de armazenamento, além de um aumento na deposição de prata após 6 meses de armazenamento em água.

Com relação ao tipo de preparo avaliado, as micrografias realizadas após 1 semana revelaram mínimos sinais de nanoinfiltração para as superfícies preparadas com o laser de fs e restauradas com os 3 sistemas adesivos. Já para as superfícies preparadas com ponta diamantada, este padrão de mínima infiltração após 1 semana de armazenamento foi observado somente para os adesivos OFL e CSE; quando restauradas com o adesivo autocondicionante de passo único (GAB), revelaram uma maior quantidade de depósitos de prata na camada híbrida e nas bolhas na camada de adesivo, já na análise em 1 semana (Figura 5.12a).

Somente os preparos realizados com ponta diamantadas, restaurados com o CSE e avaliados após 6 meses de armazenamento revelaram, além dos depósitos reticulares concentrados na camada híbrida, uma deposição de prata na camada de adesivo (Figura 5.11b).

O adesivo condicione e lave (OFL) apresentou uma camada híbrida espessa e com os menores índices de nanoinfiltração para ambos os tipos de preparo e tempo de armazenamento quando comparado com os adesivos autocondicionantes (Figura 5.10). Ambos os tipos de preparo

restaurados com este adesivo apresentaram sinais mínimos de nanoinfiltração, limitados a depósitos isolados de prata localizados na camada híbrida, mesmo após 6 meses de armazenamento em água (Figura 5.10b,d).

Figura 5.10 - Eletromicrografias obtidas em MET: Secções transversais da interface adesiva das amostras não irradiadas e preparadas com laser de fs restauradas com Optibond FL (1 semana e 6 meses); aumento de 6.000X; Setas: depósitos de prata

Figura 5.11 - Eletromicrografias obtidas em MET: Secções transversais da interface adesiva das amostras não irradiadas e preparadas com laser de fs restauradas com Clearfil SE (1 semana e 6 meses); aumento de 6.000X; CH: Camada híbrida; Setas: depósitos de prata

Para as superfícies restauradas com o sistema adesivo autocondicionante de 2 passos (CSE), a camada híbrida apresentou-se morfologicamente semelhante àquela resultante da hibridização com o sistema adesivo autocondicionante de passo único, entretanto, com depósitos de prata em menores quantidades para os 2 tipos de preparo

nos 2 tempos de armazenamento quando comparado com este último (Figura 5.11b,d).

Figura 5.12 - Eletromicrografias obtidas em MET: Secções transversais da interface adesiva das amostras não irradiadas e preparadas com laser de fs restauradas com G-aenial Bond (1 semana e 6 meses); aumento de 6.000X; Inib O₂: Camada Inibida de Oxigênio; CH: Camada híbrida; Setas: depósitos de prata

A hibridização com o sistema adesivo de passo único GAB apresentou um espessamento e extensão destes depósitos por toda a

extensão da camada híbrida após 6 meses de armazenamento, sem diferença no padrão de nanoinfiltração para os 2 tipos de preparo avaliados (Figura 5.12b,d).

Adicionalmente, foi possível observar com certa frequência a presença de bolhas localizadas na camada de adesivo, com a presença de grânulos de prata em seu interior. Além disso, uma camada intermediária entre a camada de adesivo polimerizado e o compósito, denominada camada de inibição de oxigênio, pôde ser claramente observada (Figura 5.12).

Independentemente do tipo de preparo, a hibridização da superfície dentinária com ambos os adesivos autocondicionantes revelou uma camada híbrida bem fina e com a presença de cristais de hidroxiapatita disponíveis (Figura 5.13).

Figura 5.13 - Eletromicrografia obtida em MET: Secção transversal da interface adesiva de amostra restaurada com Clearfil SE Bond evidenciando a presença de cristais de hidroxiapatita; aumento de 120.000X. Setas brancas: depósitos de prata; Setas pretas: cristais de hidroxiapatita

6 DISCUSSÃO

Os fundamentos da Odontologia moderna aplicam os conceitos da Odontologia Minimamente Invasiva, que preconiza a prevenção e a máxima preservação dos tecidos dentais (Tyas et al., 2000). Seguindo esta filosofia, métodos alternativos de preparo cavitário como os lasers, entre outros, foram introduzidos com o objetivo de remover seletivamente o tecido cariado, preservando os tecidos sadios.

O primeiro laser a ser aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1.997, nos Estados Unidos, foi o laser de Er:YAG, seguido pelo laser de Er,Cr:YSGG. Devido à alta afinidade destes lasers pela água é possível se conseguir uma remoção seletiva do tecido cariado, devido à maior quantidade de água presente neste tipo de substrato. Além disso, outras vantagens importantes relacionadas ao preparo com os lasers de érbio, como a redução microbiana, ausência de vibração, menor sensação dolorosa e maior conforto para o paciente, foram fatores que levaram a uma grande aceitação e a uma rápida difusão desta tecnologia.

Devido à grande demanda na utilização destes lasers, questões com relação à qualidade do substrato irradiado têm sido levantadas. Estudos têm relatado efeitos termomecânicos nos tecidos preparados com os lasers de érbio, capazes de comprometer a interação dos sistemas adesivos com estes substratos.

Os efeitos termomecânicos resultantes da irradiação com os lasers de érbio estão relacionados com a largura de pulso destes lasers (Fried et al., 2001), a qual pode variar de 200 a 500 μ s, classificando-os como lasers de pulsos longos.

No presente estudo, o laser de femtossegundos, que possui uma largura de pulso de 10^{-15} segundos, foi investigado como um possível método alternativo de preparo cavitário. Foram avaliadas as

características morfológicas e ultramorfológicas da dentina irradiada e sua interação com diferentes sistemas adesivos em curto e longo prazo. A importância destas avaliações é que os preparos realizados com métodos alternativos devem ser capazes não só de interagir seletivamente com o substrato, mas também de preparar adequadamente as paredes da cavidade que receberão o sistema adesivo e, subsequentemente, a restauração adesiva.

Como o princípio da Odontologia Minimamente Invasiva limita a realização do preparo cavitário somente à remoção do tecido cariado, sem a realização de retenções adicionais, a manutenção da restauração na cavidade está relacionada somente com a efetividade da interação do sistema adesivo com o substrato. Assim, uma íntima análise desta interação, mediada por diferentes sistemas adesivos, é de fundamental importância para avaliar, imediata e em longo prazo, a qualidade do substrato irradiado e o desempenho do laser de fs no preparo da dentina.

O que torna a utilização do laser de fs interessante é que o mesmo possui uma energia do pulso bastante reduzida que é absorvida em uma camada superficial extremamente fina, de aproximadamente 1 μm de espessura, e a onda de stress gerada é absorvida em uma camada da subsuperfície menor do que 1 μm (Oraevsky et al., 1996), sem danos às estruturas subjacentes.

Quanto menor a largura de pulso, menor a densidade de energia necessária para ablacionar o tecido (Oraevsky et al., 1996; Stuart et al., 1996; Kohns et al., 1997). Por possuir uma largura de pulso muito curta (10^{-15} segundos), a densidade de energia necessária para ablacionar a dentina com os lasers de fs é bastante reduzida quando comparada com aquela requerida com os lasers de pulsos longos (Mehl et al., 1997; Bello-Silva M. S. et al., 2012). Quanto maior a largura do pulso, mais longo é o processo de deposição de energia e, mesmo com a utilização de baixas densidades de energia, maior é a profundidade que esta energia é depositada no tecido (Oraevsky et al., 1996). Durante a irradiação com

lasers de pulsos com longa duração ocorre um maior aquecimento do tecido irradiado com a consequente transmissão de calor aos tecidos adjacentes.

As características morfológicas observadas em MEV da dentina irradiada com o laser de fs estão de acordo com os resultados descritos em outros trabalhos da literatura (Niemz, 1995; Serbin et al., 2002; Rode et al., 2003; Fahey et al., 2008; Ji et al., 2012), demonstrando a capacidade deste laser em realizar cortes precisos, produzindo cavidades bem delimitadas, sem qualquer alteração ou prejuízo aos tecidos adjacentes.

A análise da subsuperfície irradiada revelou túbulos dentinários íntegros, sem alterações na dentina inter e peritubular, similar ao padrão resultante do preparo com ponta diamantada. Já os efeitos termomecânicos resultantes da irradiação com os lasers de pulsos longos têm sido descritos como microtrincas na camada subsuperficial da dentina peritubular, levando à formação de uma zona de fragilidade, o que pode reduzir a resistência de união do sistema adesivo a este substrato (Cardoso et al., 2008a; Moretto et al., 2011).

Embora as irradiações com o laser de fs tenham sido realizadas sem refrigeração, à inspeção visual, não foram notados sinais de carbonização das amostras, diferentemente do que ocorre para a irradiação com os lasers de pulsos longos, na qual a refrigeração com água se faz mandatória com o objetivo de reduzir os efeitos termomecânicos na superfície irradiada, além de mediar o processo de ablação (Meister et al., 2006; Colucci et al., 2009).

Existem poucos trabalhos na literatura avaliando o aumento de temperatura durante a irradiação dos tecidos dentais com os lasers de pulsos ultracurtos (LPUC) (Rode et al., 2003; Fahey et al., 2008; Bello-Silva M. S. et al., 2012; Braun et al., 2012). Embora os LPUC não promovam a ablação através de uma interação termomecânica com o tecido, a absorção da energia radiante do laser pode levar a aumentos na

temperatura. Assim, o comprimento de onda do laser, a taxa de repetição, a velocidade de escaneamento e o diâmetro do feixe, são fatores importantes a serem cuidadosamente selecionados para obter os melhores resultados com a irradiação com os LPUC, sem efeitos indesejáveis nos tecidos (Bello-Silva M. S. et al., 2012).

Kim et al. (2000) sugeriram que um aumento da taxa de repetição e do diâmetro do feixe podem levar a um aumento de temperatura com consequente modificação da dentina devido ao acúmulo de calor, diminuindo o limiar de ablação da dentina com os LPUC. Da mesma forma, Bello-Silva et al. (2012) demonstraram diferenças significativas no aumento de temperatura para diferentes comprimentos de onda e velocidades de escaneamento com alguns LPUC, especialmente os de ps.

A temperatura é um fator primordial a ser considerado durante a irradiação dos tecidos dentais, pois um aumento excessivo da temperatura pode levar à denaturação das fibrilas colágenas (Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011). Neste estudo, a análise das micrografias em MET da subsuperfície irradiada com o laser de fs revelou uma preservação das fibrilas colágenas desde a superfície, com padrão similar ao resultante do preparo com ponta diamantada, no qual é possível observar uma organização das fibrilas desde a superfície e sem alterações em profundidade. Esse padrão contrasta com o descrito na literatura em relação ao padrão ultramorfológico observado após a irradiação com os lasers de pulsos longos, no qual as fibrilas colágenas se apresentam denaturadas na porção mais superficial, decorrentes do aumento de temperatura durante a ablação termomecânica (Ramos et al., 2010; Moretto et al., 2011). Maiores densidades de energia podem promover uma alteração nas fibras colágenas em maior profundidade (Ramos et al., 2010), prejudicando a penetração dos monômeros resinosos na rede de fibrilas durante o processo de hibridização.

A preservação da matriz de colágeno na estrutura de dentina irradiada com os LPUC pode ser explicada com base no processo de

ablação destes lasers, que não está relacionado com um aumento da temperatura, mas sim com uma alteração eletrostática que ocorre na superfície do tecido (Oraevsky et al., 1996; Kim et al., 2001). De acordo com a física do processo de ablação, ocorre uma ionização dos elétrons da superfície com a consequente avalanche destes elétrons, desencadeando a formação de um plasma e ablação do tecido com o mínimo de difusão de calor nos tecidos adjacentes (Oraevsky et al., 1996).

A integridade da estrutura orgânica (fibrilas colágenas) e inorgânica (parte mineral) da dentina, tanto para a dentina tratada com a ponta diamantada quanto para a irradiada, observada nas micrografias em MEV e MET, favoreceu a formação de interfaces de união na qual os sistemas adesivos avaliados estão intimamente ligados ao substrato.

A análise das interfaces adesivas revelaram padrões morfológicos diferentes para a hibridização com cada sistema adesivo. Tanto para o sistema adesivo do tipo condicione e lave (OFL) quanto para o autocondicionante de 2 passos (CSE), o padrão observado em MEV da interface adesiva foi similar para ambos os modos de preparo cavitário avaliados. Entretanto, para o adesivo autocondicionante de passo único (GAB), as características do preparo com o laser de fs, como a presença dos túbulos abertos em uma superfície sem a camada de esfregaço, favoreceram uma maior difusão dos monômeros resinosos deste sistema adesivo nos túbulos dentinários resultando em prolongamentos de resina mais longos quando comparados com aqueles obtidos da hibridização das superfícies preparadas com ponta diamantada; além disso, permitiu uma maior penetração do adesivo na dentina intertubular sem a interferência da camada de esfregaço.

Baseado nos aspectos microscópio da interface adesiva, pode-se explicar os maiores valores de resistência de união observados neste estudo para o GAB, aplicado sobre as superfícies irradiadas, quando comparado com sua aplicação sobre as superfícies preparadas com a ponta diamantada. Tal fato não está relacionado com o tamanho dos

prolongamentos de resina, pois estudos demonstram não haver uma correlação destes com os valores de resistência de união (Lohbauer et al., 2008), mas a uma maior penetração do adesivo na dentina intertubular, permitindo uma maior interação química deste adesivo com a hidroxiapatita do substrato. Já para as superfícies preparadas com a ponta diamantada, que se encontram cobertas por uma camada de esfregaço, a acidez dos monômeros presentes nos adesivos autocondicionantes é atenuada pela camada de esfregaço da superfície, durante o processo de hibridização dificultando a interação com a hidroxiapatita. Assim, estes monômeros ácidos enfraquecidos promovem um condicionamento parcial da dentina, criando espaços interfibrilares muito pequenos que dificultam a difusão dos monômeros resinosos (Carvalho et al., 2005), especialmente para os adesivos autocondicionantes de passo único que apresentam o primer e o adesivo misturados em um único frasco. Considerando que uma interação deficiente do adesivo com o substrato pode levar à degradação hidrolítica da interface adesiva e/ou dos materiais resinosos selecionados para a restauração, a interação do sistema adesivo com a superfície irradiada, observada neste estudo, se mostra uma alternativa interessante para o preparo da dentina.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com o estudo de Ermis et al. (2008), que relataram um aumento da resistência de união para o adesivo autocondicionante de passo único aplicado sobre superfícies dentinárias preparadas com pontas diamantadas de menor granulação, comprovando a interferência negativa da camada de esfregaço na interação deste tipo sistema adesivo com o substrato. Adicionalmente, foram testados os mesmos adesivos condicione e lave de 3 passos e autocondicionantes de 2 passos deste estudo, que não tiveram seus valores de resistência de união influenciados negativamente pela camada de esfregaço (Ermis et al., 2008).

Corroborando com o estudo anterior de Ermis et al. (2008), os adesivos condicione e lave e autocondicionante de 2 passos avaliados

neste estudo, apresentaram valores de resistência de união semelhantes, independentemente do tipo de preparo, demonstrando não serem afetados pela camada de esfregaço. O estudo conduzido por (Bello-Silva Marina Stella, 2010), que avaliou a resistência de união à dentina irradiada com o laser de fs com os mesmos parâmetros de irradiação avaliados neste estudo, também verificou um comportamento semelhante para o sistema adesivo autocondicionante CSE. Bello-Silva observou que o adesivo autocondicionante CSE apresentou os mesmos valores de resistência de união para os dois tipos de preparo (laser ou controle); entretanto, para o adesivo condicione e lave de 2 passos (Adper Single Bond 2) os valores observados para as superfícies irradiadas foram estatisticamente superiores ao grupo sem irradiação. Interessantemente, foi também verificado que a utilização do adesivo autocondicionante CSE, quando aplicado sobre as superfícies irradiadas com o laser de fs sem a utilização do primer, levou a melhores resultados de resistência de união quando comparado com sua utilização seguindo a recomendação do fabricante. Da mesma maneira, (Gerhardt-Szep et al., 2012), utilizando o laser de fs, também observou um aumento da resistência de união quando utilizado este protocolo de aplicação modificado do CSE. Entretanto, o objetivo deste último não foi a realização de um preparo da superfície dentinária, mas sim, a promoção de microrretenções na superfície da dentina, no qual o espaçamento entre as linhas de espaçamento entre as varreduras foi de 80 μm , resultando em porções quadradas de dentina não irradiada com aproximadamente 60 μm de lado.

No presente estudo, as linhas de espaçamento foram ajustadas para 4 μm , pois o objetivo foi de que um pulso ficasse levemente sobreposto ao outro, simulando um preparo de toda a superfície dentinária, uma vez que o diâmetro do pulso utilizado neste estudo foi de 4,4 μm .

Embora resultados laboratoriais testados em curto prazo demonstrem excelente efetividade de alguns sistemas adesivos, a durabilidade da união sistema adesivo/substrato em longo prazo é bastante questionável (Breschi et al., 2008; Cardoso et al., 2011; De Munck et al., 2012). Assim, técnicas de aplicação alternativas para os sistemas adesivos devem ser avaliadas também em longo prazo para avaliação de sua estabilidade e durabilidade.

Em geral, os adesivos condicione e lave de 3 passos estão associados a maiores valores de resistência de união e estabilidade hidrolítica da camada híbrida (De Munck et al., 2005a; Sarr et al., 2010; Van Landuyt KL et al., 2010). Entretanto, sua técnica de aplicação é muito sensível e o operador precisa ter um controle cuidadoso para conseguir uma umidade “ótima” da dentina e evitar uma superfície muito seca ou muito úmida, sob o risco de comprometer a efetividade da união (Tay et al., 1996; Ye et al., 2009).

Embora os testes laboratoriais tenham demonstrado, frequentemente, maiores valores de resistência de união dos adesivos condicione e lave quando comparados aos autocondicionantes de passo único (Sarr et al., 2010), um estudo clínico desenvolvido por Van Landuyt et al. (2012) demonstrou que ambos apresentaram um sucesso clínico semelhante após 5 anos de longevidade clínica. Entretanto, apesar do semelhante sucesso clínico, uma tendência crescente ao desenvolvimento de pequenos defeitos marginais e manchamentos, para o adesivo autocondicionante de passo único, superior à verificada com o adesivo condicione e lave, foi observada (Van Landuyt K et al., 2012).

A absorção de água tem sido determinada como o principal fator envolvido na degradação da interface adesiva (De Munck et al., 2006; Breschi et al., 2008; Reis AF et al., 2010). Quando expostos ao meio bucal, manchamentos e defeitos marginais, com a subsequente perda da restauração, são falhas comumente verificadas como consequências da degradação hidrolítica da camada híbrida. Embora não haja uma

correlação direta, revisões de literatura indicam haver uma tendência no comportamento dos resultados laboratoriais de resistência de união com as taxas de retenção das restaurações de classe V, especialmente para os dados de resistência de união em longo prazo (Van Meerbeek et al., 2010). Nos testes em laboratório essa degradação é medida através da diminuição dos valores de resistência de união (De Munck et al., 2005a; Reis AF et al., 2010; Cardoso et al., 2011; Pashley et al., 2011); entretanto, com limitações de acordo com o teste utilizado (Scherrer et al., 2010). Adicionalmente, essa degradação também pode ser verificada através da penetração de corantes na interface adesiva (Reis AF et al., 2010; Coutinho et al., 2011; Pashley et al., 2011). A difusão de pequenos íons ou moléculas, como a prata, em espaços nanométricos da camada híbrida, sem a presença de fendas, foi primeiramente descrita por (Sano et al., 1994), que a denominaram como nanoinfiltração.

O presente estudo mostrou uma degradação com o tempo para todos os sistemas adesivos avaliados, independentemente do tipo de preparo, através da redução significativa da resistência de união, concomitantemente com um aumento da nanoinfiltração observada em MET. Assim, parece haver uma correlação entre a diminuição dos valores de resistência de união e aumento da degradação hidrolítica da camada híbrida, como verificado anteriormente por outros autores (Okuda et al., 2002; Reis AF et al., 2010).

Os resultados observados estão condizentes com a literatura, pois é conhecido que a resistência de união e a qualidade do selamento da dentina, resultante da hibridização com os sistemas adesivos dentinários, diminuem com o tempo, tanto em estudos *in vitro* e *in vivo* (Okuda et al., 2002; Reis AF et al., 2004; Peumans et al., 2005; De Munck et al., 2011; Hass et al., 2012; Mobarak; Daifalla, 2012). Entretanto, as micrografias de MET devem ser interpretadas com muito cuidado, pois, devido à micrométrica área avaliada, associada à grande variabilidade do substrato dental e de todo o processo envolvido na preparação e avaliação dos

espécimes, a obtenção de imagens com informações representativas é bastante difícil, podendo levar a equívocos (Van Meerbeek, 2007; Coutinho et al., 2011). Coutinho et al. (2011) observaram uma grande variabilidade no padrão de nanoinfiltração dentro de uma mesma amostra, evidenciando as diferenças na posição e inclinação no corte na observação dos depósitos de prata.

O padrão de nanoinfiltração observado neste estudo refletiu a tendência do comportamento dos adesivos quanto aos valores de resistência de união observados, com melhores valores para o OFL, seguido pelo CSE e GAB, respectivamente, independente do tipo de preparo. As micrografias em MET mais representativas de cada grupo experimental revelaram uma variabilidade no padrão dos depósitos de prata, variando de pontuais e localizados a reticulares estendendo-se por toda a camada híbrida - este último também denominado árvores de água (Tay et al., 2002b). Ambos os padrões demonstraram uma degradação em longo prazo e a absorção de água tem sido determinada como o principal fator envolvido na degradação da interface adesiva (De Munck et al., 2006; Breschi et al., 2008; Reis AF et al., 2010). Assim, a transformação destes grãos isolados em árvores de água pode ser considerada como uma série de eventos que teve início com a sorção de água (Tay et al., 2002b; Breschi et al., 2008).

O padrão de nanofiniltração observado em MET foi semelhante para os 2 tipos de preparo avaliados neste estudo. A análise das micrografias em MET mais representativas de cada grupo revelaram excelentes resultados para a avaliação dos adesivos condicione e lave e autocondicionante de 2 passos após 1 semana de armazenamento em água. Já para o autocondicionante de passo único, uma pequena deposição de prata na camada híbrida formada por este adesivo já era observada neste período. As avaliações simulando um envelhecimento das amostras, promovido pelo armazenamento em água por 6 meses, revelaram um discreto aumento das deposições de prata para o adesivo

OFL, caracterizados como pontos esparsos localizados na camada híbrida. Já para o CSE, foram observados depósitos reticulares na camada híbrida e, dependendo da região observada, a observação de depósitos de prata também na camada de adesivo para as superfícies preparadas com ponta diamantada. O GAB apresentou os maiores índices de nanoinfiltração, com depósitos mais espessos quando comparado com o anterior, estendendo-se por quase toda a camada híbrida. Além disso, uma particularidade observada para este adesivo foi a presença de bolhas na camada de adesivo.

As bolhas na camada de adesivo podem originar-se da separação de fase do adesivo (Van Landuyt KL et al., 2005) ou devido à atração de água e osmose através da camada de adesivo (Van Landuyt KL et al., 2007) que se diferenciam devido a seu tamanho e localização. Estas últimas apresentam um menor tamanho e localizam-se principalmente na transição entre a camada de adesivo e do compósito, que corresponde à camada de inibição do oxigênio (Gauthier et al., 2005; Van Landuyt KL et al., 2007). Já as bolhas derivadas da separação de fase, originam-se devido a separação entre a água e os monômeros resinosos no momento da evaporação do solvente. Estas se localizam no interior da camada de adesivo e geralmente apresentam-se maiores do que as anteriores (Van Landuyt KL et al., 2008). Assim, a origem das bolhas observadas nas micrografias em MET neste estudo pode ser atribuída à separação de fase do adesivo. Isso acontece porque o GAB não possui HEMA em sua composição, mas a acetona como solvente.

O HEMA é um monômero metacrilato solúvel em água, presente na composição da maioria dos sistemas adesivos e sua função é aumentar sua molhabilidade e hidrofiliidade, facilitando sua difusão na dentina desmineralizada (Nakabayashi; Takarada, 1992), além de prevenir a separação de fase do adesivo (Van Landuyt KL et al., 2005). Entretanto, grandes quantidades de HEMA podem aumentar a sorção de água pelo adesivo, influenciando negativamente as propriedades mecânicas e

estabilidade da interface adesiva (Sidhu et al., 2007; Van Landuyt KL et al., 2008).

Assim, com o objetivo de evitar estes efeitos adversos da utilização do HEMA, foram desenvolvidos adesivos sem HEMA em sua composição, como é o caso do GAB. Entretanto, como mencionado acima, a ausência de HEMA pode favorecer a separação de fase do adesivo, incorrendo em bolhas de água na camada de adesivo polimerizada, aumentando a possibilidade de degradação hidrolítica da camada híbrida. Tal fato pôde ser constatado neste estudo através da observação das micrografias em MET após 6 meses de armazenamento em água, que revelaram intensos depósitos de prata no interior destas bolhas.

Embora seguindo as recomendações do fabricante para completa evaporação do solvente, através da aplicação de um jato de ar em intensidade máxima por 5 segundos, as micrografias em MET da interface adesiva e MEV de análise de fratura, revelaram a presença destas bolhas na camada polimerizada de adesivo. Assim, os adesivos autocondicionantes de passo único demonstram ser bastante hidrofílicos, resultando em uma camada de adesivo capaz de atrair água do meio oral e intrínseca do substrato (Tay; Pashley, 2003). Logo, a simplificação dos procedimentos de aplicação clínica do sistema adesivo pode ser realizada em detrimento da qualidade de união (Yiu et al., 2004; Breschi et al., 2008; Cardoso et al., 2011).

Os trabalhos na literatura frequentemente relatam o comportamento superior dos adesivos condicione e lave de 3 passos em relação aos adesivos autocondicionantes, especialmente os de passo único (Peumans et al., 2005; De Munck et al., 2012). Os maiores valores de resistência de união observados neste estudo para o OFL, associados à pequena quantidade de depósitos de prata localizados em sua camada híbrida, mesmo após 6 meses de armazenamento em água, demonstram sua tendência de maior estabilidade hidrolítica. Devido à sua excelente performance clínica e laboratorial, o adesivo OFL tem sido considerado

como “padrão ouro” na comparação com os demais adesivos (Peumans et al., 2005; De Munck et al., 2006; Van Meerbeek et al., 2010; Cardoso et al., 2011; Peumans et al., 2012). As propriedades mecânicas dos adesivos podem influenciar nas propriedades da interface de união e, conseqüentemente, na longevidade das restaurações.

Os depósitos de prata na camada híbrida denota que a interface de união é a região de maior fragilidade na união dos sistemas adesivos ao substrato dentinário (Breschi et al., 2008). Para os sistemas adesivos que utilizam o condicionamento ácido previamente à infiltração do adesivo, a deposição de íons de prata acontece nas regiões de fibrilas colágenas expostas, mas não envolvidas pelo adesivo, e a degradação hidrolítica da camada híbrida é atribuída à penetração de fluídos nestas porosidades (Tay et al., 2002a; Breschi et al., 2008). Já para os adesivos autocondicionantes, teoricamente, esta discrepância entre a porção desmineralizada e infiltrada deveria ser minimizada devida à capacidade destes adesivos de desmineralizar e infiltrar ao mesmo tempo. Entretanto, a análise em MET revelou a deposição de prata para estes adesivos após 6 meses de armazenamento em água, especialmente para o autocondicionante de passo único GAB.

Acredita-se que a acidez dos monômeros ácidos, presentes nos adesivos autocondicionantes, seja atenuada pela camada de esfregaço da superfície resultando em uma camada na qual os monômeros são capazes de condicionar a dentina, mas não de infiltrar em sua profundidade (Carvalho et al., 2005). Os adesivos autocondicionantes de 2 passos, apresentam um comportamento clínico similar ao condicione e lave de 3 passos OFL (Peumans et al., 2005) e os trabalhos da literatura comparam seus resultados de resistência de união aos obtidos o OFL. Isso está relacionado com sua técnica de aplicação que consiste da aplicação de um adesivo hidrofóbico após a aplicação do primer, tornando-os menos hidrofílicos, similarmente à técnica de aplicação dos sistemas adesivos condicione e lave. A importância desta camada hidrofóbica tem sido

demonstrada por diversos estudos demonstrando sua habilidade em promover um aumento dos valores de resistência de união e qualidade da interface adesiva, para os adesivos autocondicionantes de passo único (Breschi et al., 2008; Reis A et al., 2008). Entretanto, as análises das micrografias em MET revelaram um depósito superior de prata para o CSE após 6 meses de armazenamento em água quando comparado com o OFL confirmando os excelentes resultados clínicos verificados com este adesivo condicione e lave (Peumans et al., 2005; Peumans et al., 2012). Talvez em uma análise em um prazo mais longo de armazenamento em água, as diferenças entre os adesivos possam ser melhor detectadas.

O conceito mecânico da hibridização consiste na penetração de monômeros resinosos nos espaços nanométricos entre as fibrilas colágenas desmineralizadas. Entretanto, este intrincado sistema de interação com o colágeno oferece uma variedade estrutural, física e molecular que podem comprometer a interação destes monômeros com o substrato dentinário em uma escala nanométrica. Isso porque a organização da estrutura interna da fibra colágena (~100 nm) é composta por uma série de feixes de microfibrilas agrupadas (10~25 nm), onde a microfibrila mais fina pode chegar a 5 nm. Assim, os monômeros podem envolver o feixe de fibrilas, mas dificilmente conseguiria envolver cada microfibrila individualmente (Bertassoni et al., 2012). Além disso, o espaço intermolecular dentro das microfibrilas é preenchido por moléculas de água (Bella et al., 1995) podendo ser este um fator crítico para a degradação hidrolítica em longo prazo, em uma escala nanométrica (Bertassoni et al., 2012).

Como a camada híbrida é composta de diferentes substratos, seu envelhecimento pode ser devido à degradação de um ou mais fatores; assim, o máximo entendimento sobre o substrato a ser hibridizado, a composição, técnica de aplicação e propriedade mecânica dos adesivos, é de fundamental importância no planejamento das restaurações adesivas.

As análises em MEV e MET deste estudo demonstraram a capacidade dos lasers de fs em preparar adequadamente o substrato dentinário sem danos térmicos ou mecânicos às suas estruturas orgânicas e inorgânicas, sugerindo a viabilidade clínica destes lasers para preparo dos tecidos duros dentais. O completo entendimento da interação e efeitos da irradiação do laser de fs com os componentes orgânicos e inorgânicos dos tecidos dentais é imprescindível na escolha do melhor protocolo de tratamento.

As estruturas dentais remanescentes após a irradiação, além de adequadamente preservadas, devem ser receptivas aos materiais restauradores, pois a permeabilidade dentinária aos adesivos é de crucial importância para a obtenção de uma adesão eficiente (Pashley; Carvalho, 1997). Nesse sentido, este trabalho demonstrou que para os 3 diferentes sistemas adesivos avaliados, o padrão de interação e degradação foi semelhante ao obtido para as superfícies preparadas com ponta diamantada.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo *in vitro* nos permitiram concluir que:

7.1 A irradiação com o laser de fs altera a morfologia da dentina irradiada promovendo um padrão topográfico diferente daquele obtido com a ponta diamantada, e restrito somente à superfície, sem alteração negativas da subsuperfície dentinária, tanto para o conteúdo orgânico como inorgânico.

7.2 Os parâmetros de irradiação dos lasers de fs avaliados neste estudo promoveram valores de resistência de união da resina à dentina irradiada semelhantes aos valores obtidos com a técnica convencional de preparo cavitário com ponta diamantada, independentemente do tempo de avaliação.

7.3 Todos os adesivos apresentaram um decréscimo dos valores de resistência de união após 6 meses de armazenamento para os 2 tipos de preparo avaliados.

7.4 A hibridização das superfícies irradiadas resulta na formação de uma camada híbrida irregular, com íntimo contato com a superfície dentinária.

7.5 Os adesivos autocondicionantes apresentaram um aumento dos depósitos de prata após 6 meses de armazenamento nas superfícies hibridizadas após o preparo com ponta diamantada e laser de fs.

REFERÊNCIAS

Aranha AC, De Paula Eduardo C, Gutknecht N, Marques MM, Ramalho KM, Apel C. Analysis of the interfacial micromorphology of adhesive systems in cavities prepared with Er,Cr:YSGG, Er:YAG laser and bur. *Microsc Res Tech*. 2007;70(8):745-51.

Bader C, Krejci I. Indications and limitations of Er:YAG laser applications in dentistry. *Am J Dent*. 2006;19(3):178-86.

Bella J, Brodsky B, Berman HM. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure*. 1995;3(9):893-906.

Bello-Silva MS. Análise morfológica e da resistência adesiva dos tecidos dentais duros irradiados com lasers de pulsos ultracurtos [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2010.

Bello-Silva MS, Wehner M, de Paula Eduardo C, Lampert F, Poprawe R, Hermans M, et al. Precise ablation of dental hard tissues with ultra-short pulsed lasers. Preliminary exploratory investigation on adequate laser parameters. *Lasers Med Sci*. 2012 in press.

Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater*. 2012;8(7):2419-33.

Braun A, Wehry RJ, Brede O, Dehn C, Frentzen M, Schelle F. Heat generation caused by ablation of restorative materials with an ultrashort pulse laser (USPL) system. *Laser Med Sci*. 2012;27(2):297-303.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008;24(1):90-101.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955;34(6):849-53.

Cardoso MV, Coutinho E, Ermis RB, Poitevin A, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Influence of Er,Cr:YSGG laser treatment on the microtensile bond strength of adhesives to dentin. *J Adhes Dent*. 2008a;10(1):25-33.

Cardoso MV, Coutinho E, Ermis RB, Poitevin A, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Influence of dentin cavity surface finishing on micro-tensile bond strength of adhesives. *Dent Mater*. 2008b;24(4):492-501.

Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J*. 2011;56 Suppl 1:31-44.

Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent*. 2004;17(2):104-8.

Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*. 2005;26(9):1035-42.

Ceballos L, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Marshall GW. Bonding to Er-YAG-laser-treated dentin. *J Dent Res*. 2002;81(2):119-22.

Colucci V, do Amaral FL, Pecora JD, Palma-Dibb RG, Corona SA. Water flow on erbium:yttrium-aluminum-garnet laser irradiation: effects on dental tissues. *Lasers Med Sci*. 2009;24(5):811-8.

Coutinho E, Cardoso MV, Fernandes CP, Neves AA, Gouvea CV, Van Landuyt KL, et al. Nanoleakage distribution at adhesive-dentin interfaces in 3D. *J Dent Res*. 2011;90(8):1019-25.

de Almeida Neves A, Coutinho E, Cardoso MV, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Current concepts and techniques for caries excavation and adhesion to residual dentin. *J Adhes Dent*. 2011;13(1):7-22.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005a;84(2):118-32.

De Munck J, Vargas M, Iracki J, Van Landuyt K, Poitevin A, Lambrechts P, et al. One-day bonding effectiveness of new self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *Oper Dent*. 2005b;30(1):39-49.

De Munck J, Shirai K, Yoshida Y, Inoue S, Van Landuyt K, Lambrechts P, et al. Effect of water storage on the bonding effectiveness of 6 adhesives to Class I cavity dentin. *Oper Dent*. 2006;31(4):456-65.

De Munck J, Mine A, Vivan Cardoso M, De Almeida Neves A, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Effect of dentin location and long-term water storage on bonding effectiveness of dentin adhesives. *Dent Mater J*. 2011;30(1):7-13.

De Munck J, Mine A, Poitevin A, Van Ende A, Cardoso MV, Van Landuyt KL, et al. Meta-analytical Review of Parameters Involved in Dentin Bonding. *J Dent Res*. 2012;91(4):351-7.

de Oliveira MT, Reis AF, Arrais CA, Cavalcanti AN, Aranha AC, de Paula Eduardo C, et al. Analysis of the interfacial micromorphology and bond strength of adhesive systems to Er:YAG laser-irradiated dentin. *Lasers Med Sci*. 2012.

do Amaral FL, Colucci V, de Souza-Gabriel AE, Chinelatti MA, Palma-Dibb RG, Corona SA. Adhesion to Er:YAG laser-prepared dentin after long-term water storage and thermocycling. *Oper Dent*. 2008;33(1):51-8.

Dutra-Correa M, Nicolodelli G, Rodrigues JR, Kurachi C, Bagnato VS. Femtosecond laser ablation on dental hard tissues-Analysis of ablated profile near an interface using local effective intensity. *Laser Phys*. 2011;21(5):965-71.

Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater*. 2008;24(6):786-98.

Ermis RB, De Munck J, Cardoso MV, Coutinho E, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Bond strength of self-etch adhesives to dentin prepared with three different diamond burs. *Dent Mater*. 2008;24(7):978-85.

Eugenio S, Sivakumar M, Vilar R, Rego AM. Characterisation of dentin surfaces processed with KrF excimer laser radiation. *Biomaterials*. 2005;26(33):6780-7.

Eversole LR, Rizoiu IM. Preliminary investigations on the utility of an erbium, chromium YSGG laser. *J Calif Dent Assoc*. 1995;23(12):41-7.

Fahey M, Onyejekwe O, Mason H, Mitra K. Precise dental ablation using ultra-short-pulsed 1552 nm laser. *Int J Heat Mass Transf.* 2008;51(23-24):5732-9.

Feit MD, Rubenchik AM, Kim BM, da Silva LB, Perry MD. Physical characterization of ultrashort laser pulse drilling of biological tissue. *Appl Surf Sci.* 1998;127:869-74.

Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22.

Franjic K, Cowan ML, Kraemer D, Miller RJ. Laser selective cutting of biological tissues by impulsive heat deposition through ultrafast vibrational excitations. *Opt Express.* 2009;17(25):22937-59.

Freitas AZ, Freschi LR, Samad RE, Zezell DM, Gouw-Soares SC, Vieira ND. Determination of ablation threshold for composite resins and amalgam irradiated with femtosecond laser pulses. *Laser Physics Letters.* 2010;7(3):236-41.

Freitas PM, Navarro RS, Barros JA, de Paula Eduardo C. The use of Er:YAG laser for cavity preparation: an SEM evaluation. *Microsc Res Tech.* 2007;70(9):803-8.

Fried D, Ragadio J, Champion A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6 microm. *Lasers Surg Med.* 2001;29(3):221-9.

Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res.* 1979;58(4):1364-70.

Gauthier MA, Stangel I, Ellis TH, Zhu XX. Oxygen inhibition in dental resins. *J Dent Res.* 2005;84(8):725-9.

Gerhardt-Szep S, Werelius K, de Weerth F, Heidemann D, Weigl P. Influence of femtosecond laser treatment on shear bond strength of composite resin bonding to human dentin under simulated pulpal pressure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100(1):177-84.

Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature.* 1964;203:417.

Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *J Dent*. 2012.

Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med*. 1989;9(4):338-44.

Hibst R. Mechanical effects of erbium:YAG laser bone ablation. *Lasers Surg Med*. 1992;12(2):125-30.

Ji L, Li L, Devlin H, Liu Z, Jiao J, Whitehead D. Ti:sapphire femtosecond laser ablation of dental enamel, dentine, and cementum. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):197-204.

Jiao J, Guo ZX. Analysis of plasma-mediated ablation in aqueous tissue. *Appl Surf Sci*. 2012;258(17):6266-71.

Kenshima S, Francci C, Reis A, Loguercio AD, Filho LE. Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. *J Dent*. 2006;34(10):775-83.

Kim BM, Feit MD, Rubenchik AM, Joslin EJ, Eichler J, Stoller PC, et al. Effects of high repetition rate and beam size on hard tissue damage due to subpicosecond laser pulses. *Appl Phys Lett*. 2000;76(26):4001-3.

Kim BM, Feit MD, Rubenchik AM, Joslin EJ, Celliers PM, Eichler J, et al. Influence of pulse duration on ultrashort laser pulse ablation of biological tissues. *J Biomed Opt*. 2001;6(3):332-8.

Kohns P, Zhou P, Stormann R. Effective laser ablation of enamel and dentine without thermal side effects. *J Laser Appl*. 1997;9(3):171-4.

Koibuchi H, Yasuda N, Nakabayashi N. Bonding to dentin with a self-etching primer: the effect of smear layers. *Dent Mater*. 2001;17(2):122-6.

Koshiro K, Sidhu SK, Inoue S, Ikeda T, Sano H. New concept of resin-dentin interfacial adhesion: the nanointeraction zone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;77(2):401-8.

Kruger J, Kautek W, Newesely H. Femtosecond-pulse laser ablation of dental hydroxyapatite and single-crystalline fluoroapatite. *Appl Phys Mater Sci & Proc.* 1999;69:S403-S7.

Li ZZ, Code JE, Van De Merwe WP. Er:YAG laser ablation of enamel and dentin of human teeth: determination of ablation rates at various fluences and pulse repetition rates. *Lasers Surg Med.* 1992;12(6):625-30.

Lohbauer U, Nikolaenko SA, Petschelt A, Frankenberger R. Resin tags do not contribute to dentin adhesion in self-etching adhesives. *J Adhes Dent.* 2008;10(2):97-103.

Mehl A, Kremers L, Salzmann K, Hickel R. 3D volume-ablation rate and thermal side effects with the Er:YAG and Nd:YAG laser. *Dent Mater.* 1997;13(4):246-51.

Meister J, Franzen R, Forner K, Grebe H, Stanzel S, Lampert F, et al. Influence of the water content in dental enamel and dentin on ablation with erbium YAG and erbium YSGG lasers. *J Biomed Opt.* 2006;11(3):34030-7.

Mobarak EH, Daifalla LE. Long-term nanoleakage depth and pattern of cervical restorations bonded with different adhesives. *Oper Dent.* 2012;37(1):45-53.

Moretto SG, Azambuja N, Jr., Arana-Chavez VE, Reis AF, Giannini M, Eduardo Cde P, et al. Análise morfológica de superfícies dentinárias irradiada com os lasers de Er:YAG e Er,Cr:YSGG. *UNOPAR Cient Cienc Biol Saúde.* 2010;12(1):6.

Moretto SG, Azambuja N, Jr., Arana-Chavez VE, Reis AF, Giannini M, Eduardo Cde P, et al. Effects of ultramorphological changes on adhesion to lased dentin-Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy analysis. *Microsc Res Tech.* 2011;74(8):720-6.

Murray AK, Dickinson MR. High-speed photography of plasma during excimer laser-tissue interaction. *Phys Med Biol.* 2004;49(15):3325-40.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982;16(3):265-73.

Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater.* 1992;8(2):125-30.

Navarra CO, Cadenaro M, Codan B, Mazzoni A, Sergo V, De Stefano Dorigo E, et al. Degree of conversion and interfacial nanoleakage expression of three one-step self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(4):463-9.

Neves AA, Coutinho E, Cardoso MV, de Munck J, Van Meerbeek B. Micro-tensile bond strength and interfacial characterization of an adhesive bonded to dentin prepared by contemporary caries-excitation techniques. *Dent Mater.* 2011;27(6):552-62.

Niemz MH. Investigation and Spectral-Analysis of the Plasma-Induced Ablation Mechanism of Dental Hydroxyapatite. *Appl Phys B-Lasers Opt.* 1994;58(4):273-81.

Niemz MH. Cavity preparation with the Nd:YLF picosecond laser. *J Dent Res.* 1995;74(5):1194-9.

Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of resin dentin interface: nanoleakage vs. microtensile bond strength. *Oper Dent.* 2002;27(3):289-96.

Oliveira SS, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW, Jr. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system. *Dent Mater.* 2003;19(8):758-67.

Oraevsky AA, DaSilva LB, Rubenchik AM, Feit MD, Glinsky ME, Perry MD, et al. Plasma mediated ablation of biological tissues with nanosecond-to-femtosecond laser pulses: Relative role of linear and nonlinear absorption. *I J Sel Topics Quantum Electron.* 1996;2(4):801-9.

Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int.* 1993;24(9):618-31.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent.* 1997;25(5):355-72.

Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1-16.

Perdigao J. Dentin/enamel bonding. *J Esthet Restor Dent*. 2010a;22(2):82-5.

Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*. 2010b;26(2):e24-37.

Peters MC, McLean ME. Minimally invasive operative care. I. Minimal intervention and concepts for minimally invasive cavity preparations. *J Adhes Dent*. 2001;3(1):7-16.

Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*. 2005;21(9):864-81.

Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. A 13-year clinical evaluation of two three-step etch-and-rinse adhesives in non-carious class-V lesions. *Clin Oral Investig*. 2012;16(1):129-37.

Ramos AC, Esteves-Oliveira M, Arana-Chavez VE, de Paula Eduardo C. Adhesives bonded to erbium:yttrium-aluminum-garnet laser-irradiated dentin: transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and tensile bond strength analyses. *Lasers Med Sci*. 2010;25(2):181-9.

Reis A, Rocha de Oliveira Carrilho M, Schroeder M, Tancredo LL, Loguercio AD. The influence of storage time and cutting speed on microtensile bond strength. *J Adhes Dent*. 2004;6(1):7-11.

Reis A, Albuquerque M, Pegoraro M, Mattei G, Bauer JR, Grande RH, et al. Can the durability of one-step self-etch adhesives be improved by double application or by an extra layer of hydrophobic resin? *J Dent*. 2008;36(5):309-15.

Reis AF, Arrais CA, Novaes PD, Carvalho RM, De Goes MF, Giannini M. Ultramorphological analysis of resin-dentin interfaces produced with water-based single-step and two-step adhesives: nanoleakage expression. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71(1):90-8.

Reis AF, Carrilho MR, Ghaname E, Pereira PN, Giannini M, Nikaido T, et al. Effects of water-storage on the physical and ultramorphological features of adhesives and primer/adhesive mixtures. *Dent Mater J*. 2010;29(6):697-705.

Rizoiu I, Kohanghadosh F, Kimmel AI, Eversole LR. Pulpal thermal responses to an erbium,chromium: YSGG pulsed laser hydrokinetic system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;86(2):220-3.

Rode AV, Gamaly EG, Luther-Davies B, Taylor BT, Graessel M, Dawes JM, et al. Precision ablation of dental enamel using a subpicosecond pulsed laser. *Aust Dent J*. 2003;48(4):233-9.

Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*. 1994;19(2):59-64.

Sarr M, Kane AW, Vreven J, Mine A, Van Landuyt KL, Peumans M, et al. Microtensile bond strength and interfacial characterization of 11 contemporary adhesives bonded to bur-cut dentin. *Oper Dent*. 2010;35(1):94-104.

Sattabanasuk V, Vachiramon V, Qian F, Armstrong SR. Resin-dentin bond strength as related to different surface preparation methods. *J Dent*. 2007;35(6):467-75.

Scherrer SS, Cesar PF, Swain MV. Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: a critical literature review. *Dent Mater*. 2010;26(2):e78-93.

Serbin J, Bauer T, Fallnich C, Kasenbacher A, Arnold WH. Femtosecond lasers as novel tool in dental surgery. *Appl Surf Sci*. 2002;197:737-40.

Sidhu SK, Omata Y, Tanaka T, Koshiro K, Spreafico D, Semeraro S, et al. Bonding characteristics of newly developed all-in-one adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80(2):297-303.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser beam effect on dental hard tissues. *J Dent Res*. 1964;43(5sp):873.

Stuart BC, Feit MD, Herman S, Rubenchik AM, Shore BW, Perry MD. Nanosecond-to-femtosecond laser-induced breakdown in dielectrics. *Phys Rev B*. 1996;53(4):1749-61.

Tay FR, Gwinnett AJ, Pang KM, Wei SH. Resin permeation into acid-conditioned, moist, and dry dentin: a paradigm using water-free adhesive primers. *J Dent Res*. 1996;75(4):1034-44.

Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent*. 2002a;4(4):255-69.

Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res*. 2002b;81(7):472-6.

Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK, et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res*. 2003;82(7):537-41.

Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc*. 2003;69(11):726-31.

Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry--a review. FDI Commission Project 1-97. *Int Dent J*. 2000;50(1):1-12.

Van Landuyt K, Peumans M, De Munck J, Van Meerbeek B. Five-year clinical performance of a HEMA-free one-step self-etch adhesive [abstract 545]. *J Dent Res*. 2012;91 Spec Iss: C.

Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2005;84(2):183-8.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Origin of interfacial droplets with one-step adhesives. *J Dent Res*. 2007;86(8):739-44.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. The role of HEMA in one-step self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2008;24(10):1412-9.

Van Landuyt KL, De Munck J, Mine A, Cardoso MV, Peumans M, Van Meerbeek B. Filler debonding & subhybrid-layer failures in self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2010;89(10):1045-50.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003;28(3):215-35.

Van Meerbeek B. The "myth" of nanoleakage. *J Adhes Dent*. 2007;9(6):491-2.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater*. 2010;26(2):e100-21.

Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):17-28.

Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(2):279-86.

Wei S, Sadr A, Shimada Y, Tagami J. Effect of caries-affected dentin hardness on the shear bond strength of current adhesives. *J Adhes Dent*. 2008;10(6):431-40.

Ye Q, Wang Y, Spencer P. Nanophase separation of polymers exposed to simulated bonding conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):339-48.

Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, et al. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*. 2004;25(26):5789-96.

Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*. 2004;83(6):454-8.

Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;19:515-30.

APÊNDICE A - Resultados do teste linear de efeitos mistos

	Grau de Liberdade	Graus de liberdade do numerador	Valor de F	Valor de p
Intersecção	1	428	183,515	<0,0001
Ades	2	54	18,66266	<0,0001
Armaz	1	428	44,01421	<0,0001
Prep	1	54	0,43438	0,5126
Ades:Prep	2	54	2,36348	0,1038
Armaz:Prep	1	428	19,27981	<0,0001
Ades:Armaz	2	428	1,8602	0,1569

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Brasil

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 27 de abril de 2012.

CEP/FOUSP/OF.59/12

Senhora Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo verificou o cumprimento das questões solicitadas no PARECER Nº100/2012, REGISTRO CONEP 16796, do Protocolo 60/11 - CAAE 0068.0.017.000-11 – onde a CONEP considerou aprovado o Projeto de Pesquisa **"Estudo longitudinal da resistência e qualidade de união da resina composta à dentina irradiada com laser de femtossegundo"**, de responsabilidade da Pesquisadora Simone Gonçalves Moretto, sob sua orientação.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Sem mais, subscrevo-me atenciosamente.

Prof. Dra. **Marcia Tereza Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP

Ilma Sra.
Profa Dra Patricia Moreira de Freitas
Pesquisadora Simone Gonçalves Moretto
ODD

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - Tel. (0XX11) 3091-7960

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição estrangeira

BIOMEDICAL SCIENCES GROUP
FACULTY OF MEDICINE, DEPARTMENT OF ORAL HEALTH SCIENCES
CONSERVATIVE DENTISTRY, LEUVEN BIOMAT RESEARCH CLUSTER
KAPUCIJENVOER 7 BUS 7001, BE-3000 LEUVEN

KATHOLIEKE
UNIVERSITEIT
LEUVEN

To whom it may concern
Research Ethics Committee
Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo

OUR REF.
YOUR REF.
LEUVEN

12/12/2011

As Head of the "Leuven BIOMAT Research Cluster" (Adhesive Dentistry section) at the Catholic University of Leuven, I hereby confirm that our laboratory is rightfully registered at the University's Ethical Committee for conducting research in the area of adhesive dentistry whenever it involves the use of human teeth. Therefore, all related research projects carried out in our facilities are duly approved by the mentioned Ethical Committee before the start of the experiments. The teeth used in these projects are consciously donated by patients of governmental institutions for research purposes according to the applicable ethical legislation.

Sincerely,

Bart Van Meerbeek

PROF. DR. BART VAN MEERBEEK
TEL + 32 16 33 75 87 FAX + 32 16 33 27 52
bart.vanmeerbeek@med.kuleuven.be
www.kuleuven.be; www.kuleuven.be/dental; med.kuleuven.be/biomat

ASSOCIATIE
K.U. LEUVEN